Eine neue Methode zur Bestimmung der Cholinesterase II

Ralf Böttger

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0032

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des Städtischen
Krankenhauses München-Harlaching
Chefarzt Privatdozent Dr. M. Knedel

Eine neue Methode zur Bestimmung der Cholinesterase II

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ralf Böttger
München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Privatdozent Dr.M. Knedel

Coreferent: Prof. Dr. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.72

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung

I. Definition der Cholinesterasen 7

II. Praktische und theoretische Gebiete, in denen das Enzym eine Rolle spielt

III. Methodendiskussion und Aufgabenstellung

Hauptteil

I. Spezielle Abgrenzung der Cholinesterasen 8

II. Historisches 9

III. Bildungsort der Pseudocholinesterase - Theorien und Beweise

IV. Die physiologische Funktion des PsChE 10

V. Klinik und Cholinerstase II.

1. Echte Erkrankungen mit Hypo- und Hypercholinesterasämie 10

2. Genetisch bedingte Veränderungen der PsChE - die PsChE - Varianten 13

a) Das "dibucain-resistente" Enzym
b) Das "fluorid-resistente" Enzym
c) Vollständige Abwesenheit von PsChE-Aktivität, verursacht durch ein "stilles" Gen
d) Ein anderer Phänotyp läßt sich nur durch die Elektrophorese erkennen
e) Erhöhte PsChE-Aktivität und erhöhte SuCh-Resistenz

3. Vergiftungen mit ChE-Hemmstoffen 15

VI. Cholinesterase II - physikalische und chemische Eigenschaften 16

		Seite
VII.	ChE-Inhibitoren	17
	1. Organo-Phosphor-Verbindungen	
	2. Carbamate	
	3. Tertiäre und quarternäre Stickstoffverbindungen	
VIII.	Das "aktive Zentrum" der ChEsen	18
IX.	Die Kinetik der Substratspaltung	19
X.	Methoden zur Bestimmung und Darstellung des PsChE.	19
	Bestimmungen im Blut, Plasma, Serum und Gewebshomogenisat	24
	1. Die manometrische Bestimmung	
	2. Die titrimetrische Bestimmung	
	3. Die jodometrische Bestimmung	
	4. Die elektrometrische Bestimmung	
	5. Die spektralphotometrische Bestimmung	
	6. Die kolorimetrische Bestimmung	
	7. Die photometrische Bestimmung	
	8. Die Testpapiermethode	
	Bestimmung der PsChE in der Histochemie	
	Die elektrophoretische Bestimmung der PsChE	
XI.	Eigene Untersuchungen zur Entwicklung einer neuen Methode	
	1. Die Methode von Weber - ihre Reproduzierbarkeit	24
	2. Untersuchungen über die Spezifität der PsChE-Bestimmung mit AThCh als Substrat	25
	3. Untersuchungen über die Spezifität von S-Butyryl-thiocholinjodid als Substrat im Vergleich zum AThCh	29
	4. Untersuchungen mit Puffern, die für eine neue Methode geeignet erscheinen	33
	5. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten	38

		Seite
6.	Untersuchungen über das Verhältnis zwischen Substratkonzentration und Spaltungsgeschwindigkeit durch PsChE mit BuThCh als Substrat	40
7.	Diskussion der Ergebnisse unter 4. und 6.	60
8.	Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Methode, über die Abhängigkeit von der Temperatur und über die Konstanz der Reaktion	62
9.	Untersuchungen zur Bestimmung der Dibucainzahl	65
10.	Die Methode zur Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum und zur Ermittlung der Dibucainzahl	68
11.	Die Ermittlung der Normalwerte	71
12.	Andere Bedingungen	74
13.	Beschreibung des Testverfahrens, das zur Zeit bereits konfektioniert verfügbar ist	75
14.	Klinische Prüfung der neuen Bestimmungsmethode der PsChE mit BuThCh als Substrat	
	a) Akute Hepatitis	77
	b) Akute Schockleber	85
	c) Chronische Hepatitis	86
	d) Lebercirrhose kompensiert	87
	e) Lebercirrhose dekompensiert	
	f) Lebercirrhose + Proteinurie	89
	g) Cirrhose nach Amöbenhepatitis	
	h) Fettleber ohne Entzündung	
	i) Cholelithiasis	
	k) Carcinome	
	l) Rechtsherzinsuffizienz dekompensiert	
	m) Vergiftungsfälle	90
15.	PsChE-Varianten in der Klinik	
	a) Eine "dibucain-resistente" Variante	91
	b) Vermutlich eine "silent gen"-PsChE-Variante	92

Seite

16. Untersuchungen anhand eines Serums mit der "dibucain-resistenten" Variante - eine einfache photometrische Bestimmungsmethode für das atypische Enzym zu erarbeiten 93

17. Beziehungen zwischen Dibucainkonzentration und PsChE-Aktivität bei den drei PsChE-Typen 97

18. Die photometrische Bestimmung der Dibucainzahl 101

19. Diskussion der Arbeit 103

Zusammenfassung 114

Abkürzungen

ACh	=	Acetylcholin
AChE	=	Acetylcholinesterase
Alb.	=	Albumine
Alk.Ph.	=	Alkalische Phosphatase
APh	=	Alkalische Phosphatase
AThCh	=	Acetylthiocholin
BeCh	=	Benzoylcholin
Bili	=	Bilirubin, gesamt
BuCh	=	Butyrylcholin
BuThCh	=	S-Butyrylthiocholinjodid
CAF	=	Cellulose-Acetat-Folie
Ch	=	Cholin
ChE	=	Cholinesterase (allgemein) oder in Tabellen PsChE
ChE II	=	PsChE
DFP	=	Diisopropylfluorophosphat
DN	=	Dibucainnumber (Dibucainzahl)
DThbNBS	=	5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoat)
EChE	=	Erythrozytencholinesterase
E 605	=	Parathion
FN	=	Fluoridnumber (Fluoridzahl)
GE	=	Gesamteiweiß
GlDH	=	Glutamat-Lactat-Dehydrogenase
Glob.	=	Globuline
LAP	=	Leucinaminopeptidase
LDH	=	Lactatdehydrogenase
M	=	Molarität
m	=	Mann
PrCh	=	Propionylcholin
PsChE	=	Pseudocholinesterase
PZ	=	Prothrombinzeit
SDH	=	Sorbitdehydrogenase
SGOT	=	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

SGPT	=	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Thym.	=	Thymoltrübungstest
TRIS	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
w	=	Frau

A EINLEITUNG

I. Definition der Cholinesterasen (E.C. 3117 u. E.C. 3118)

Cholinesterasen (ChEsen) sind Enzyme des tierischen und menschlichen Organismus, die neben einigen anderen Estern die des Cholins besonders schnell spalten. Ein besonderes Merkmal ist, daß sie durch Eserin (10^{-5}M) kompetitiv hemmbar sind (227).

II. Praktische und theoretische Gebiete, in denen das Enzym eine Rolle spielt

Zwei Typen von ChEsen werden unterschieden nach dem Vorkommen im Organismus, nach spezifischem Substratabbau und nach spezifischer Hemmbarkeit. Der sogenannten Acetylcholinesterase (AChE) kommt die größte Bedeutung zu in der Spaltung des sowohl an den Synapsen und Muskelendplatten als auch an den Synapsen des autonomen Nervensystems und den Nervenendigungen des Parasympathicus freigesetzten Acetylcholins (156). Damit ist dieser Typ eine Domäne der Pharmakologie und Toxikologie.
Die Pseudocholinesterase (PsChE) (196), deren physiologische Funktion noch unbekannt ist, kommt hauptsächlich in der Leber und im Blutserum vor. Nachdem bekannt war, daß dieses Enzym bei Erkrankungen der Leber erniedrigt ist (Antopol et al. 9), wurde die Aktivitätsbestimmung dieses Typs im Serum und Plasma bei Lebererkrankungen zum Gegenstand vieler Veröffentlichungen. Das Verhalten der PsChE-Aktivität wurde aber auch bei vielen anderen Erkrankungen erforscht.
Die PsChE ist leicht zugänglich im Serum und deshalb von toxikologischem Interesse zum Nachweis und Studium von Vergiftungen mit ChE-Hemmstoffen in vivo und in vitro. Die Entdeckung mehrerer genetischer Varianten der PsChE machte dieses Enzym zu einem der am besten erforschten in der Pharmakogenetik. In diesem Zusammenhang erlangt das Enzym oft lebenswichtige Bedeutung in der Anästhesie bei der Gabe des Muskelrelaxans Succinylbischolin.
Theoretisch sind die Biochemie und der Mechanismus der Substratspaltung ungemein interessant.

III. Methodendiskussion und Aufgabenstellung.

Wegen der großen Bedeutung der ChEsen für die Medizin ist es dazu gekommen, daß eine fast unübersehbare Anzahl von Methoden zu deren Bestimmung entwickelt wurde. Einzelne Ergebnisse miteinander zu vergleichen ist fast unmöglich. Eine große Zahl von Methoden ist so aufwendig, daß sie

für den Routinebetrieb ausscheidet. Andere wiederum sind abzulehnen wegen der Unspezifität der verwendeten Substrate, nämlich meist Acetylcholin (ACh). So ergab sich eine gewisse Notwendigkeit, eine einfache, spezifische und schnelle colorimetrische Methode zur Bestimmung der PsChEse-Aktivität im Serum anhand neuerer Reagentien zu entwickeln.

Um den Nutzen für die innere Medizin mit dem für die Anästhesie zu verbinden, wurde die Bestimmung der Dibucainzahl zum Nachweis der atypischen PsChE, die appliziertes Succinylcholin nicht umsetzen kann, anhand eines solchen atypischen Enzyms in diese Methode eingeführt. In der Arbeit wird der Wert dieser Methode klinisch geprüft bei Leberkrankheiten, bei Herzinsuffizienz, nach Apnoe durch Succinylcholingabe und bei Vergiftungsfällen mit E 605. Außerdem wird über theoretische und praktische Ergebnisse berichtet, soweit sie die Aufgaben dieser Arbeit berühren.

B HAUPTTEIL

I. Spezielle Abgrenzung der ChEsen.

ChEsen sind unspezifisch, d.h. sie spalten viele Substrate. Neben den Estern des Cholins hydrolysieren sie auch Substrate der Arylesterasen (E.C. 3112) und Aliesterasen (E.C. 3113), wie Phenylester. Im allgemeinen werden Cholinester nicht durch andere Esterasen angegriffen. Die Hemmbarkeit mit 10^{-5}M Eserin grenzt die ChEsen noch deutlicher ab. Weitere Anti-ChEsen sind Polyalkylphosphate, sogenannte Nervengase, und die Antimyasthenika (98). Der Mechanismus der Substratspaltung ist bei beiden Enzymtypen gleich. Neben der unterschiedlichen Verteilung im Organismus zeigen die beiden ChE-Typen unterschiedliches Verhalten gegenüber verschiedenen Substraten: Während die AChE mit optimaler Geschwindigkeit die Acetate der Cholin- und "Nichtcholin"ester spaltet und Butyrate nicht umsetzt (274), hydrolysiert die PsChE Butyrate (276) mit optimaler Geschwindigkeit.

Ein spezifisches Substrat der AChE ist gegenüber der PsChE das D-Acetyl-α-methylcholin (37, 133).

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Typen besteht darin, daß die AChE durch Substratüberschuß (ACh u.a.) gehemmt wird (4), während die PsChE lediglich bei der Benzoylcholin (BeCh)-Hydrolyse durch Substratüberschuß gehemmt werden kann (145).

Es wurden spezfische Hemmstoffe sowohl der AChE als auch der PsChE gefunden, so daß auf diesem Wege ebenfalls eine Trennung möglich ist.

II. Historisches

Dale gibt 1914 an, daß es ein Enzym geben muß, das ACh spaltet, nachdem er diesen Wirkstoff durch Vagusreiz im Herzen hatte nachweisen können (50). Andere Autoren bestätigten seine Theorie (1, 178, 220).

Dieses Enzym kommt in fast allen tierischen Geweben vor, jedoch nicht im Pflanzenreich (220). Stedman et al. gab dem Enzym, das er aus Pferdeserum gewann, den Namen Cholinesterase (245). Stedman und Simonart erkannten (246), daß das Enzym des Serums Butyrylcholin (BuCh) und Propionylcholin (PrCh) schneller als ACh spaltet.

Weitere wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen den Enzymen des Serums und der Erythrozyten fanden Alles und Hawes (4), Richter und Croft (227) und Mendel und Rudney (196). Zeller und Bisegger schlugen 1943 ein Versuchsmodell für das "aktive Zentrum" der beiden ChE-Typen vor (290).

Durch diese Arbeiten stand fest, daß es zwei Typen von ChEsen gibt. Während die AChE in allen Tierspezies vorkommt (190, 191, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 220) und zumindest in den Erythrozyten kaum einer Schwankung unterworfen ist, wurde die Aktivitätsbestimmung der PsChE, ihr elektrophoretischer und histochemischer Nachweis, so wie die Bestimmung genetischer Varianten zum Gegenstand vielseitiger Forschung.

III. Bildungsort der PsChE-Theorien und Beweise.

Bereits 1937 nahmen Antopol et al. (9) an, daß die PsChE ein Produkt der Leberzelle sei, weil Leberschädigung regelmäßig zu einem Abfall der PsChE-Aktivität im Serum führte.

Die experimentelle Schädigung der Leberfunktion mit Tetrachlorkohlenstoff führte bei Tieren zu starkem Abfall der PsChE-Aktivität (32, 33, 152). Dies war für die Autoren der Beweis, daß die Leberzelle der Sitz der Synthese der PsChE ist. Ähnliche Versuche konnten diese Aussage erhärten (42, 163, 189, 234).

Mit ihren Untersuchungen über die Korrelation zwischen Albumingehalt und PsChE-Aktivität im Serum konnten Faber (68), Frémont-Smith (72), Kunkel (163), Levine (171, 172) und Stefenelli (250) als Bildungsort der PsChE die Leber annehmen. Gomorri (91, 92, 93, 94) Koelle (154, 155), Bertrand und Kahlson (26, 138) wiesen histochemisch im Lebergewebe sehr hohe PsChE-Aktivitäten nach.

Der Vergleich zwischen PsChE-Aktivität im Serum und histochemisch in der Leberzelle bei Gesunden (105) soweit beim Patienten mit Lebererkrankungen, so-

wie mit akuten oder chronischen Durchblutungsstörungen der Leber und bei erniedrigter oder völlig fehlender PsChE-Aktivität im Serum (52, 102, 103) brachten eindeutig den indirekten Nachweis, daß die Leberzelle der Hauptsyntheseort der PsChE im Organismus sein muß.

Diese Leistungen bestätigen alle Autoren, die sich für die Aktivitätsbestimmung der PsChE im Serum als Routineuntersuchung ausgesprochen hatten.

IV. Die physiologische Funktion der PsChE.

Die physiologische Funktion der PsChE ist bis heute ungeklärt. Vielleicht weisen Überlegungen auf den richtigen Weg, die dem Enzym eine Rolle im Fettstoffwechsel der Säugetiere zuweisen (46), da nach Meinung von Whittaker (276), sowie Burgen und McIntosh (38) das BuCh das natürliche Substrat der PsChE ist.

Eine membranabdichtende Wirkung hatten nach Beznak (28) die PsChEsen und das durch Eserin gehemmte Enzym am gewaschenen energiearmen Froschherzen. Dieses Ergebnis bestätigt die Meinung anderer Autoren, die der PsChE Funktionen sowohl für die normale Muskelkraft des Herzens (243) als auch beim Ionentransport des Skelettmuskels zuschreiben (150, 164). Die schnelle Spaltung cholinergischer Substanzen aus dem Stoffwechsel kann bei der normal so hohen Aktivität der PsChE nicht die einzige Aufgabe im Organismus sein.

V. Klinik und ChE II

1. Erkrankungen mit Hypo- und Hypercholinesterasämie.

Die Bestimmung der PsChE im Serum sollte einheitlich geschehen. Nur so ist eine klare Beurteilung der Bedeutung der PsChE für die Klinik möglich. Im folgenden werden aus der Literatur einige Erkrankungen in Beziehung zur PsChE-Aktivität aufgezeigt.

Zuerst wäre die akute Hepatitis zu erwähnen, bei der durch mehrfache Bestimmung der PsChE-Aktivität eine Verlaufskontrolle als direkter Parameter der Leberfunktion möglich wird.

Zu Beginn der akuten Hepatitis sinkt die PsChE-Aktivität meist unter die Norm ab (24, 148, 151, 158, 166, 186, 216, 233).

Während bei normalem Verlauf die Aktivität wieder langsam zur Norm ansteigt und oft über die Normwerte hinausgeht (151, 158, 216, 233), bleibt sie bei Progredienz der Erkrankung erniedrigt (148, 151, 232). Kellen (148) schlägt zum Nachweis der anikterischen Hepatitis vor, bei jedem Blutspender die PsChE-Aktivität zu bestimmen.

Die Einzelbestimmung zur Diagnose der Hepatitis hat wenig Wert; die mehrmalige Kontrolle der Werte im Verlauf der Erkrankung hat prognostische Bedeutung (151, 166, 270).

Eine direkte Beziehung zwischen Parenchymschaden der Leber und der PsChE-Aktivität muß nach den Untersuchungen von Gürtner (102, 103, 104, 105) angenommen werden. Es ist deshalb nicht erstaunlich, daß eine große Zahl von Autoren der Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum bei chronischen Leberparenchymerkrankungen eine große Aussagekraft zumessen (9, 32, 34, 40, 41, 43, 53, 54, 56, 72, 89, 90, 96, 119, 135, 146, 147, 149, 151, 158, 163, 165, 167, 172, 176, 185, 186, 192, 199, 216, 225, 232, 233, 235, 241, 242, 248, 249, 251, 265, 266, 267, 268, 270, 272, 273). Besonders bei dekompensierter Lebercirrhose zeigt die PsChE extrem niedrige Werte (151, 158, 216).

Die schon erwähnte Korrelation zwischen Albuminen und PsChE im Blutserum kann sich nach Stefenelli (250) unter bekannten Bedingungen lösen. Bei der akuten Hepatitis sinkt die PsChE-Aktivität schnell ab, während sich der Albumingehalt des Blutes wegen der längeren Halbwertszeit kaum ändert. Eine leichte Erniedrigung der PsChE bei gleichbleibendem Albuminspiegel hat Maier (184) bei Cortisontherapie nachgewiesen. Infolge anhaltenden Albuminverlustes, klinisch und tierexperimentell, ist die Albuminneubildung (55, 95, 177) beträchtlich gesteigert und nach der Meinung Stefenellis gekoppelt damit die PsChE-Synthese (250). So ist erklärbar, daß bei Proteinurie und Nephrose die PsChE-Aktivität bei niedrigem Albuminspiegel erhöht ist, weil die PsChE im Gegensatz zu den Albuminen ein sehr hohes Molekulargewicht hat und bei diesen Erkrankungen nicht nierengängig ist (67, 98, 163, 184, 212, 267). Sogar bei Lebercirrhose mit Albuminverlust kommt es zu hoher PsChE-Aktivität im Serum (247).

Leicht erhöhte PsChE-Aktivität wurde gefunden bei Icterus juvenilis Meulengracht (249), Thyreotoxikose (9, 82, 117, 132, 259), Schizophrenie (77), bei Hypertension (222), akuten Gemütserkrankungen und nach Gehrinerschütterung (226). Diese Aussagen sind von rein theoretischem Interesse, weil durch die geringere PsChE-Aktivitätserhöhung keine Diagnose gestellt werden kann. Vielmehr wird das ein Ausdruck für erhöhte Stoffwechselleistung sein. Dem entgegengesetzt sind folgende Ergebnisse: Heinecker et al. (124) und Haus (115) fanden bei Herzinfarkt vorübergehend niedrige PsChE-Aktivität. Das

Verhalten der PsChE im Serum nach operativen Eingriffen studierten mehrere Kliniker (35, 114, 115, 131, 132, 157, 183, 270). Am dritten bis sechsten postoperativen Tag kommt es zu einem signifikanten Abfall der Aktivität. Nach zwei bis drei Wochen ist bei komplikationslosem Verlauf die Ausgangsaktivität wieder erreicht. Doenicke und Holle (53) führen dieses Phänomen auf eine vorübergehende Leberschädigung zurück. Histochemische Darstellung der PsChE in der Leber nach akutem Kollaps und akuter Leberstauung (103) zeigen sehr deutlich, wie schnell die Leberzelle ihre PsChE-Aktivität verlieren kann. Bereits 1943 wiesen Frommel et al. erniedrigte PsChE-Werte im Serum im traumatischen Schock nach (75) und führten darauf einen Anstieg des AChs im Organismus zurück. Andere Forscher dieser Zeit beschäftigten sich mit dem Phänomen von PsChE-Abfall im Serum im Zusammenhang mit der vegetativen Tonuslage beim anaphylaktischen Schock und allergiebedingten Erkrankungen (2, 120, 121, 122, 224). Solche Ergebnisse werden mit der Freisetzung von Histamin und Serotonin erklärt, die bei Infusionen zur Depression der ChEsen führen (59, 60, 137), denn Histamin und Serotonin hemmen ChEsen (5, 18, 27, 108, 260, 271).

Diese Phänomene müssen aber von einer direkten oder indirekten Leberschädigung getrennt werden. Carcinome des Magen-Darm-Traktes führen in 52% zu einer erniedrigten PsChE-Aktivität (54), besonders bei Metastasen in der Leber und beim primären Lebercarcinom (200). Jedoch auch Tumoren außerhalb der Verdauungsorgane, ja selbst Infektionskrankheiten (116, 130), Hypothyreoidismus (117, 259) sowie chronische Unterernährung (10, 81), niedrigere Stoffwechselaktivität und verkonsumierende Erkrankungen, z.B. Urämie, verursachen eine Senkung der PsChE-Aktivität. Richterich (229) vertritt die Ansicht, daß bei allen Erkrankungen, die mit einer negativen Stickstoffbilanz einergehen, eine Hemmung der "Luxusfunktion" PsChE-Synthese in der Leber zustandekommt. Nicht eindeutig zu erklären sind die Ergebnisse von Lundine (179), Lüthy (180), Ord (214), Burn (39) und Sabine (231), die eine Depression der ChEsen nach Röntgenbestrahlung feststellen konnten. Lundine und Clanedson fanden einen Maßstab, wie man prüfen kann, ob eine Population einer ernsthaft schädigenden Strahlendosis ausgesetzt war. Eine direkte Röntgenbestrahlung des Serums oder gereinigter ChE soll zu Aktivitätsverlusten führen (17a). Diese Hypothese könnte zu einer guten

Kontrolle jener Patienten führen, die einer therapeutischen Bestrahlung ausgesetzt werden müssen.

Außerdem soll hier nur kurz erwähnt werden, daß der PsChE bei der Diagnose, Prognose und Behandlung der Myasthenia gravis eine gewisse Bedeutung zukommt (36, 61, 99, 100, 129, 132, 166, 193, 215, 230, 278).

2. Genetisch bedingte Veränderungen der PsChE - die PsChE-Varianten (51, 141, 143)

Die Entdeckung von genetisch bedingten PsChE-Varianten ist eng verbunden mit der Einführung des Muskelrelaxans Succinylbischolin (SuCh). Bekannt war, daß Patienten mit niedriger PsChE-Aktivität infolge Erkrankungen der Leber eine verlängerte Apnoe nach SuCh-Gabe hatten (30, 65, 66).

Nachdem aber auch Fälle von verlängerter Apnoe nach SuCh bei Patienten beobachtet worden waren, die organisch völlig gesund waren und eine stark erniedrigte PsChE-Aktivität hatten, mußte eine vererbbare PsChE angenommen werden, die SuCh nicht abzubauen vermag (30, 70, 169).

a) Das "dibucainresistente" Enzym

Kalow und Genest erarbeiteten eine Methode, mit der das atypische Enzym nachgewiesen werden kann (141). Die Verteilung und Vererbung in der kanadischen Bevölkerung wurde danach bestimmt (142). Über die Wirkung des atypischen Enzyms auf verschiedene Cholinester und die Hemmung durch ChE-Inhibitoren siehe 51, 143. Die Bestimmungsmethode wird unten beschrieben. Danach gibt es drei Phänotypen:

α) Das normale Enzym, das durch 1×10^{-4}M Dibucain bei pH 7.4 und 26°C mit 5×10^{-5}M BeCh'Chlorid als Substrat über 70% gehemmt wird;

ß) Der für atypische PsChE homozygote Typ wird nur zu ca. 20% gehemmt;

γ) Einen intermediären Typ zwischen 43% und 70% Hemmung unter den gleichen Bedingungen der Analyse.

Nach Goedde und Schoepf findet man bei ca. 96,2 % der Menschen den normalen Typ, bei 3,6% den intermediären Typ und unter 2.500 - 4000 Personen einmal das atypische Enzym (84). Der intermediäre Typ ist heterozygot und enthält sowohl normale PsChE als auch das "dibucainresistente" Enzym (83, 86, 174). Über formalgenetische Untersuchungen und ausführliche Diskussion der Probleme siehe 15, 86, 88.

b) Das "fluoridresistente" Enzym

Nachdem Kalow et al. das Phänomen der Apnoe nach SuCh-Gabe bei völlig gesunden Personen geklärt hatten, fanden Harris und Whittaker 1961 eine weitere, mit der "dibucainresistenten" eng verbundene genetische Variante (109). Danach wird die "dibucainresistente" Variante zu ca. 23% durch 5 x 10^{-5}M Natriumfluorid gehemmt mit 5 x 10^{-5}M BeCh-Chlorid als Substrat bei pH 7.4. Der intermediäre Typ wird zwischen 43% und 55% gehemmt, während das normale Enzym eine Fluoridzahl von 55 bis 70 hat. Einige Heterozygote ließen sich nicht eindeutig zuordnen, so daß eine weitere PsChE-Variante angenommen wurde (109, 111, 170). Danach sind sowohl der homozygote Typ für "fluoridresistentes" Enzym als auch die Kombination heterozygot für "Fluoridresistenz" (Fluoridzahl 26 bis 36) plus heterozygot für "Dibucainresistenz" (Dibucainzahl 52 bis 54) empfindlich für SuCh (170, 175, 277). Homozygote für "Fluoridresistenz" sind äußerst selten.

c) Vollständige Abwesenheit von PsChE-Aktivität, verursacht durch ein "stilles" Gen (52, 173)

Lidell, Lehmann und Silk fanden bei einem Patienten, der eine lange Apnoe nach SuCh-Gabe hatte, keine PsChE-Aktivität im Serum. Diese Person war völlig gesund und hatte eine normale ChE-Aktivität der Erythrocyten. Histochemische Untersuchungen eines gleichen Falles durch Doenicke et al. (52) machten deutlich, wie Lehmann et al. schon angaben, daß es ein weiteres Allelenpaar gibt, das ein Enzym ohne Hydrolysefähigkeit kontrolliert. Die Häufigkeit solcher Personen ist ca. 0,001%. Hierzu und zur Häufigkeit der anderen PsChE-Typen siehe Goedde et al. (85). Auch bei dieser Variante gibt es einen heterozygoten Typ mit 50% PsChE-Aktivität.

d) Ein anderer Phänotyp läßt sich nur durch die Elektrophores erkennen (112)

Es wurde bewiesen, daß dieser Typ mit einer besonderen Bande in der Elektrophorese nicht-allel mit den oben beschriebenen Typen ist (113).

e) Erhöhte PsChE-Aktivität und erhöhte SuCh-Resistenz (210)

Neitlich untersuchte einen gesunden Mann, dessen PsChE-Aktivität das dreifache der Norm betrug. Dieser Typ trat familiär auf. Die Elektrophorese zeigte eine besonders langsam wandernde Bande. Der Verfasser vermutet, daß der beschriebene Fall ein Heterozygoter ist, mit

einem Allel, das ein aktiveres Enzym bewirkt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es einige pharmakologisch wichtige PsChE-Typen gibt, die SuCh sehr langsam oder nicht abbauen. Eine interessante Arbeit von Goedde et al. (87) beweist, daß, wie schon viele andere Autoren angaben (31, 71, 144, 168, 275), das SuCh enzymatisch durch die PsChE im menschlichen Serum abgebaut wird.

SuCh-empfindlich sind:

- o Das homozygot "dibucainresistente" Enzym (DN ca. 20, FN 23) mit einer Häufigkeit in der Bevölkerung von einem unter 2.500 - 4.000.
- o Das homozygot "fluoridresistente" Enzym (FN 35, DN 66), das sehr selten auftritt.
- o Anenzymie durch das "silent gen" mit einer Häufigkeit von ca. 0,001%.
- o Heterozygote für "Dibucainresistenz" plus "Fluoridresistenz" (DN 49, FN 35), die sehr selten zu finden sind.
- o Heterozygote für das "dibucainresistente" plus durch das "silent gen" kontrollierte Enzym: Sehr selten.
- o Heterozygote für das "fluoridresistente" plus durch das "silent gen" kontrollierte Enzym, von denen bisher kein einziger Fall beschrieben wurde.

All diese für die Anästhesie wichtigen PsChE-Varianten sollten mit einer guten Bestimmungsmethode erfaßbar sein.

3. Vergiftungen mit ChE-Hemmstoffen.

Die Verwendung von ChE-Inhibitoren als Kontaktgifte bei der Schädlingsbekämpfung hat sowohl zu zahlreichen gewerblichen Vergiftungen in der Landwirtschaft als auch zu akzidentiellen,suicidalen und kriminellen Vergiftungen geführt. Die Verwendung von sogenannten Nervengasen wie "Tabun", "Sarin", "Soman" und "DFP", die starke ChE-Inhibitoren sind, in der chemischen Kriegsführung wirft Probleme zur Bekämpfung und Prophylaxe dieser grauenhaften Vergiftung auf.

1965 wurden im Pflanzenschutzverzeichnis 20 solcher Insecticide unter 58 Handelsbezeichnungen und 1966 25 unter 65 Handelsbezeichnungen vorgestellt (289). Die Gifte können sowohl percutan als auch per os hochwirksam werden (153, 181, 239). Zur klinischen Schnelldiagnose ist die Bestimmung der PsChE-Aktivität ein wichtiges Hilfsmittel (238, 244). Andere Autoren

warnen, die alleinige Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum zur Diagnose "Vergiftung mit ChE-Hemmstoffen" heranzuziehen, wegen der genetischen Varianten, die eine niedrige PsChE-Aktivität verursachen (64). Jedenfalls wird die endgültige Diagnose durch den Nachweis der Hemmung der EChE gestellt.

Die Vergiftung verläuft dramatisch. Über Literatur der Symptomatik und Elementarhilfe siehe 45, 98, 139, 140, 181, 244. Die Therapie der akuten Vergiftung ist sehr gut beschrieben bei v. Clarmann (45). Nachdem Lüttringshaus und Hagedorn (182) ein sehr spezielles Antidot entwickelt hatten, fand dieses schnell Eingang in die Therapie (62, 63, 289). Toxogonin soll den Nachweis von PsChE im Serum beeinträchtigen (79).

Der biochemische Vorgang der Inhibition wird später beschrieben.

Neben der Hämodalyse und der Frischblutgabe bei schweren irreversiblen Vergiftungen, die eine gewisse PsChE-Aktivität zurückbringen, wird von uns vorgeschlagen, wie bei der Behandlung der Blutungsübel Plasma-Konzentrate zu verwenden, die aus PsChE-angereicherten Fraktionen hergestellt werden könnten. Solche Präparate wären auch dem Anästhesisten bei der Behandlung SuCh-vergifteter Patienten mit atypischer PsChE nützlich.

VI. ChE II

Physikalische und chemische Eigenschaften.

Das Molekulargewicht der PsChE wurde von Surgenor und Ellis nach 3.400-facher Anreicherung durch Alkoholfraktionierung (Havard-Fraktion IV/6/4) und Aufstellen eines Ultrazentrifugendiagramms mit 300.000 angenommen, die molare Konzentration im Plasma zu 2×10^{-8} M (252). Dieselbe Fraktion enthielt 11% Hexose. Daraus schlossen die Autoren, daß PsChE ein saures Glykoproteid sei. Die Behandlung von menschlichem Serum mit Sialidase (Neuraminidase) führte zur Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit der PsChE-Bande in der Phorese (253). Die PsChE wandert auf DEAE-Cellulose zwischen Albumin und Coeruloplasmin, bei Papierelektrophorese zwischen α_2- und ß-Globulinen, nach Sialidaseeinwirkung mit den γ-Globulinen. Dabei wurde der isoelektrische Punkt der PsChE von 3,5 auf 7 verändert. Die Enzymaktivität wird nicht beeinflußt. Svensmark schloß daraus, daß die PsChE ein saures Glykoproteid (Sialoproteid) ist, das mehrere Sialinsäurereste trägt, die für die elektrophoretische Beweglichkeit des Enzyms verantwortlich sind.

De Grouchy (101) konnte bei der Stärkegelelektrophorese und der kombinier-

ten zweidimensionalen Elektrophorese in Filterpapier und Stärkegel vier Fraktionen mit PsChE-Aktivität erhalten. Harris et al. (110) bezeichnete diese Fraktionen mit C_1 - C_4. Sie unterscheiden sich nur in der Molekülgröße. Eine C_5-Bande (112) tritt bei Neugeborenen und familiär auf. Die C_4-Bande enthält den Hauptteil der PsChE-Aktivität.

Durch Gelfiltration auf SEPHADEX G-200 erhält man drei PsChE-Banden aus Lebergewebe (254).

Über die verwendeten Substrate bei der Chromatographie und Elektrophorese siehe unten.

Die PsChE hydrolysiert im alkalischen Bereich BuCh und Be Ch mit optimaler Geschwindigkeit als selektive Substrate gegenüber der AChE (145, 276). Vom ACh zum BuCh nimmt die Spaltungsgeschwindigkeit zu, darüber hinaus wieder ab (145).

PsChE verseift auch bis-Cholinester der aliphatischen Dicarbonsäuren (C_4 - C_{10}). Die Thiocholinester werden in gleichem Maße wie die Cholinester hydrolysiert, ebenso die Cholinester der Brom- und Fluoressigsäure. Auch Phosphorsäureester des Cholins sind spaltbar. Weiterhin werden durch die PsChE neben einigen "Nicht-Cholinestern" auch Substrate anderer Esterasen gespalten (3). Über Zusammenstellungen der Substrate der ChEsen siehe 107a, 156.

VII. ChE-Inhibitoren

Kann bereits die Bevorzugung bestimmter Stoffe als Substrate auf die Enzymkinetik und das "aktive Zentrum" der ChEsen hinweisen, so wurden durch Untersuchungen mit Inhibitoren erst klare Vorstellungen gewonnen.

1. Organo-Phosphor-Verbindungen.

   Starke Inhibitoren, die mit dem Enzym eine echte Verbindung eingehen können, sind die organischen Phosphorverbindungen, die als Insecticide und Kampfgase im Gebrauch sind. Die Hemmung der ChEsen wird nach länger dauernder Einwirkung irreversibel (211).

2. Carbamate.

   Die Derivate der Carbaminsäure, wie Eserin und Prostigmin, sind "schlechte" Substrate der ChEsen (13, 14, 205, 285, 286, 287). Die Carbamate sind nach der chemischen Konfiguration dem ACh sehr ähnlich, charakteristisch ist der quarternäre oder tertiäre Stickstoff im bestimmten Abstand zur Esterbindung.

3. Tertiäre und quartärnäre Stickstoffverbindungen.

Viele Alkaloide mit quartärnärem oder tertiärem Stickstoffatmom sind Hemmstoffe der ChE, obwohl dieses sicher nicht ihre pharmakologische Wirksamkeit ausmacht. Die Hemmung ist leicht reversibel, ja, ihre Anwesenheit beschleunigt sogar die Hydrolyse mancher Substrate (71.

VIII. Das "aktive Zentrum" der ChEsen.

Wenn die unter VII. genannten drei Stoffgruppen das Enzym hemmen können, muß das eng mit dem Aufbau des "aktiven Zentrums" der ChEsen zusammenhängen. Wilson, Bergmann und Nachmansohn konnten auf Grund solcher Überlegungen ein Modell des "aktiven Zentrums" der ChEsen aufzeigen, das allen Forderungen gerecht wurde (19, 20, 21, 22, 23,279, 280, 281, 282). Das "aktive Zentrum" enthält zwei Gruppen: Eine negativ geladene ("anionic side"), an die sich der positiv geladene Teil des Substrates durch elektrostatische Kräfte anlagert, und eine positiv geladene ("esteratic side"), an die die Esterbrücke des Substrates gebunden wird. Es werden sich also solche Stoffe am "aktiven Zentrum" bevorzugt anlagern, die von beiden Gruppen gebunden werden. So können Substrate mit hoher Affinität zum Beispiel die Hemmung mit DFP verhindern (47, 97), weil das DFP sozusagen nicht an das "aktive Zentrum" herankommt und dadurch keine Blockierung der esteratischen Seite möglich ist. Versuche mit radioaktivem Phosphor im DFP zeigten, daß bei vielen Esterasen, die durch diese Substanz gehemmt werden, so auch der ChE, nach peptischer Verdauung und Reinigung der markierte Phosphor an einem Serin anzutreffen war (48, 213, 237). Für Butyrylcholinesterase-DFP wurde gefunden (136):

- Phe - Gly - Glu - Ser - Ala - Gly - (Ala - Ala - Ser) -
$\quad\quad\quad

IX. Die Kinetik der Substratspaltung.

Schaefer schlug 1947 eine Theorie der Substratspaltung vor, die für beide ChE-Typen Gültigkeit hat (80, 107, 236). Nach Krupka und Laidler muß die Substratspaltung folgendermaßen vor sich gehen (159, 160, 162):

$$E + S \underset{-k_1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{-k_2}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} ES' + P_1 \xrightarrow{k_3} E + P_2$$

Vom gebildeten Michaelis- Komplex (ES) wird der alkoholische Teil vom Substrat getrennt und geht in Lösung. Das acylierte Enzym (ES') wird anschließend hydrolysiert. Die Autokatastase (Substrathemmung bei Substratüberschuß) wird dadurch erklärt, daß ein nächstes Substratmolekül schon gebunden wird, wenn das acylierte Enzym noch nicht hydrolysiert ist. Alle Erscheinungen werden aber nicht erklärbar (117a, 188, 283), so daß bezweifelt wird, ob die ChEsen überhaupt der Theorie nach Michaelis und Menten gehorchen (106).

Die Wechselzahl der ChEsen ist stark abhängig vom pH, von Aktivatoren und Inhibitoren und vom Substrat. Myers bestimmte die Wechselzahl von Serumcholinesterase (SChE) mit 58 000 x Min $^{-1}$ (202).

Die Umsetzung von ACh durch PsChE wird durch einwertige Kationen gehemmt, durch zweiwertige beschleunigt (195), das pH-Optimum (ACh = 1 x 10^{-2}M) liegt zwischen pH 9,0 und 9,5 (118). Die Hydrolyse der Cholinester nimmt bei fallendem pH (7 gegen 5) zugunsten der Synthese aus den Spaltprodukten ab (6, 127, 128, 280, 281).

Mit zunehmender Temperatur steigt die Aktivität von PsChE nicht linear an, sondern folgt der Gleichung nach Kavanan, bei der je nach Temperatur ein inaktiver Teil einen aktiven Teil des Enzyms gegenübersteht (201).

X. Methoden zur Bestimmung und Darstellung der PsChE.

Bestimmungen im Blut, Plasma, Serum und Gewebshomogenisat.

Zur Einleitung sei eine Methode von Albus angegeben (2), der die Aktivität der ChE im Blut auf folgende Weise bestimmte: Blut wird mit einer bestimmten Menge ACh nach verschiedenen Inkubationszeiten einer Trendelenburgschen Katze injiziert. Der Abfall des Blutdrucks wird registriert und in einzelnen Kurven aufgetragen. Dabei zeigten sich beim latenten Allergiker erniedrigte ChE-Werte gegenüber Gesunden.

Schon einige Jahre vorher gaben Stedman und Eason (245) eine titrationscolorimetrische Methode an.

Die Methode von Ammon und Voss im Warburg-Apparat ist bis heute eine der genauesten:

1. Die manometrische Bestimmung (7)
   Die aus 1 : 200 verdünntem Serum aus 0,375%igem ACh-Chlorid freigesetzte Essigsäure treibt aus Hydrogenkarbonat - Kohlensäure - Puffer in Ringerlösung quantitativ ein Äquivalent Kohlendioxyd aus. Der Druckanstieg in einer Stunde wird gemessen und auf µMol Gas pro Stunde umgerechnet. Im Meßvolumen von 2,0 ml wird absolut nach der eingesetzten Menge Serum auf Einheiten = µMol ACh/hxml umgerechnet. Die Umrechnung auf andere Einheiten ist nicht möglich. Normalwerte: Richter und Croft (227), Ammon und Zapp (8). Über die Verteilung im Plasma nach Alter und Geschlecht: Shanor et al. (240).
   Der Vorteil dieser Methode liegt in der Modifikation und der Genauigkeit. Man kann fast alle Substrate einsetzen, ja sogar die EChE bestimmen (11, 240).
2. Die titrimetrische Bestimmung.
   Unter den vielen titrimetrischen Bestimmungsmethoden sei die nach Barbosa Hargreaves und Da Silva als Beispiel angeführt (17).
   Serum, 1 : 21, verseift in 20 ml 1 x 10^{-2}M ACh in Natriumacetat mit Magnesiumchloridzusatz. Nach Inkubation wird die Reaktion durch 5 ml Aceton gestoppt und mit 0,01 n Natronlauge mit Phenolphtalein als Indikator titriert. Die verbrauchte Natronlauge, mit dem Faktor 16,3 multipliziert, ergibt die Menge ACh in mg, die in einer Stunde von einem ml Serum hydrolysiert wird = 1 E.
   Normalwerte: 10,73 E $\pm$ 18,6%.
   Auch diese Methode läßt sich mit anderen Substraten modifizieren.
3. Die jodometrische Bestimmung (12, 197).
   Durch PlasmaChE wird 1 x 10^{-2}M Butyrylthiocholin (BuThCh) bei pH 7,4 gespalten. Das freiwerdende Thiocholin wird jodometrisch bestimmt. Die Bestimmung der EChE erfolgt mit 1 x 10^{-2}M Acetylthiocholin (AThCh).
4. Die elektrometrische Bestimmung (198, 223).
   Die durch 0,1 ml Serum (Verdünnung 1 : 110) aus 37,3 mg ACh in einer Stunde bei 25°C freigesetzte Essigsäure verändert den pH-Wert in der Lösung. Die Methode ist sowohl zur Bestimmung der PsChE als auch der EChE geeignet.

Normalwerte: Serum $\bar{x} \pm 2\,s$ = 0,53 - 1,24 ΔpH / h
Erythrocyten " = 0,44 - 1,09 ΔpH / h

Siehe auch 288!

Die ACh-Konzentration bei der EChE-Bestimmung ist 66% von der bei der Serum-ChE-Bestimmung. Die Methode ist recht aufwendig, für den Nachweis einer Vergiftung mit ChE-Hemmern aber gut geeignet. Die Werte sind nicht übertragbar.

5. Die spektralphotometrische Bestimmung.

a) Methode nach Kalow und Genest (141).
Bei pH 7,4 und 26°C spaltet PsChE (Serum 1 : 200) 5×10^{-5}M Benzoylcholin (BeCh)-Chlorid. Der Abfall von BeCh wird bei Wellenlänge λ = 240 nm direkt gemessen. Mit 1×10^{-5}M Dibucain in einem zweiten Ansatz wird die Dibucainzahl bestimmt.
Normalwerte: ΔE / 3 Min. = 80 - 130.
Die Werte sind direkt mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten in internationale Einheiten umrechenbar. Die Methode war bisher die genaueste und schnellste zur Ermittlung der Dibucainzahl.

b) Schnelltest zur Orientierung über ChE-Varianten mit Ro 2-0683 $1,13 \times 10^{-6}$M (143).

c) Gal und Roth (76)
geben eine Methode an, bei der AThCh verwendet wird und die Aufspaltung der C-S-Bindung bei Wellenlänge λ = 229 nm gemessen wird.
Ebenfalls mit AThCh: Das Thiocholin reduziert 2,6-Dichloridphenol. Diese Reaktion wird bei 600 nm gemessen.

d) Optischer Test.
Freigesetztes Cholin (Ch) wird durch Ch-Dehydrogenase in Betainaldehyd und Wasserstoff gespalten. Der Wasserstoff reduziert mit Cytochromreduktase das Cytochrom C. Die Absorption von Cytochrom wird gemessen (29).

6. Die colorimetrische Bestimmung.
Die Verschiebung des pH durch die aus ACh freigesetzte Essigsäure wird mit Phenolrot als Indikator bei Wellenlänge λ = 533 nm colorimetrisch gemessen und die Werte auf einer pH-Standardkurve ermittelt (199).

7. Die photometrische Bestimmung.

a) Die Eisen-III-Methode (126, 134).

ACh, $4,5 \times 10^{-2}$M, wird bei 37°C und pH 8,2 über eine Stunde verseift. Das restliche ACh wird mit Hydroxamsäure in Acethylhydroxamsäure überführt und diese als brauner Eisen-III-Komplex bei λ = 540 nm gemessen.

Normalwerte: 130 - 310 Einheiten / ml.

Diese Methode wird heute noch oft verwendet (88, 217, 221).

b) o-Nitrophenylbutyrat,

$1,3 \times 10^{-2}$M, wird bei pH 7,6 durch Serum (1 : 1.500) 30 Minuten lang bei 25°C gespalten. Dann wird die Reaktion mit DFP gestoppt und bei λ= 414 nm das freigesetzte o-Nitrophenyl direkt gegen den gleichen Ansatz gemessen, der schon vor Serumzugabe DFP enthält (187).

c) Die photometrische Nitroprussidbestimmung der Thiogruppen, die aus Thioestern freigesetzt werden (194).

d) Bestimmung der Thiogruppen nach AThCh-Spaltung mit 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DThbNBS) (1, 58, 78).

α) Methode nach Garry und Routh (78).

Die PsChE macht aus AThCh bei pH 7,4 das Thiocholin frei, das mit DThbNBS reagiert und einen gelben Farbstoff erzeugt. Nach drei Minuten Inkubation wird mit Chininsulfat abgestoppt und bei Wellenlänge λ= 412 nm die Absorption gegen den Leerwert, der durch vorherige Zugabe von Chininsulfat ermittelt wird, gemessen. Die Einheiten, freigesetzte SH-Gruppen / 3 Min. durch 1 ml Serum, werden anhand einer Glutathion-Eichkurve abgelesen.

Normalwerte: Männer 7,8 - 16,6 E
Frauen 5,8 - 13,8 E

ß) Kinetische Methode nach Weber (269).

Bei pH 7,4 wird mit AThCh, $5,0 \times 10^{-3}$M, die Reaktion gestartet. Die Serumverdünnung ist 1 : 111. Der molare Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ= 410 nm wurde mit frischem Glutathion ermittelt und beträgt 13,3.

Normalwerte: $\bar{x} \pm 2\,s$ = 1900 - 3800 IU

$$IU = \frac{\Delta E/Min}{\varepsilon \times d} \times 10^6 \times \frac{EV}{AV} \quad \left[\mu Mol \times Min^{-1} \times L^{-1}\right]$$

Die Methode ist seit 1967 im Handel*) und wird unten beschrieben.

8. Die Testpapiermethoden.

a) "Acholest"^{R}-Testpapier (233).

Das Papier ist mit einem Cholinderivat und einem Indikator (saures pH = gelb, neutrales pH = blau) imprägniert. Nach Serumzusatz (0,05 ml) wird die Farbe zunächst blau (Serum-pH = 7,4). Die freiwerdende Essig- oder Propionsäure verändert die Farbe zu gelb. Das Zeitintervall zwischen Kontakt mit dem Serum und Übereinstimmung mit dem Vergleichsstreifen (festeingestelltes pH) wird als Maß für die PsChE-Aktivität verwendet.

b) Teststreifen mit Bromthymolblau als Indikator für die Wasserstoffionenkonzentration (125).

Die aus ACh-Bromid freigesetzte Säure verändert die Farbe des Papiers mittels des Indikators. Gegen Vergleichsstreifen, die verschieden festen pH ausgesetzt sind, wird nach 10 - 60 Minuten abgelesen.

Bestimmung der PsChE in der Histochemie.

Schon lange wird die PsChE in Gewebsschnitten histochemisch dargestellt (91). Koelle und Friedenwald führten die Thiocholinester bei histochemischem Nachweis ein (154, 155). Freigesetztes Thiocholin reagiert mit Kupfersalzen zum Kupferthiocholin, das mit Ammonium-Sulfid zum schwarzbraunen Kupfersulfid ausfällt. Gürtner et al. (103) machten die histochemische PsChE-Darstellung fast zu einer Routinemethode.

Die elektrophoretische Bestimmung der PsChE,

wurde bereits erwähnt. Das Substrat ist meist Alpha-Naphtyl-Acetat, dessen Spaltprodukte mit verschiedenen Verbindungen Farbkomplexe eingehen (69, 255, 256, 257, 258, 261). Weitere Substrate sind AThCh und BuThCh (257), Indoxylacetat (262), Beta-Carbonaphtooxycholin (263, 264).

Diskussion.

Wegen der Mannigfaltigkeit der Bestimmungsmethoden ist es nicht möglich, allgemeingültige Aussagen bei verschiedenen Erkrankungen zu machen. Die

*) TCE Boehringer & Söhne, Tutzing

meisten Methoden verwenden noch ACh oder seine Derivate, wobei nicht sicher ist, ob im Serum ebenfalls eine AChE vorkommt (72, 218, 219). Die Meinungen sind jedenfalls geteilt (25). Außerdem wird durch leichte Hämolyse die hochaktive EChE freigesetzt, die auch bei PsChE-Mangel und genetisch bedingter Anenzymie normal ist, und wird die Ergebnisse verfälschen.
Viele Methoden sind zu aufwendig für den Routine-Betrieb im Laboratorium. Die Teststreifenmethoden könnten nur über die Aktivität orientieren,sind aber zur exakten Bestimmung, die zum Nachweis leichten PsChE-Anstieges oder -Abfalls nötig ist, nicht geeignet.
Selektive Substrate der PsChE sind BuCh und BeCh (145). Durch Koelle und Friedenwald wurde BuThCh zum histochemischen Nachweis der PsChE angewendet (154, 155). Andere Autoren (12, 76) verwenden BuThCh für den klinisch-chemischen Nachweis. Durch Ellmann (57) wurde die DThbNBS als Farbreagens zum Nachweis von freien SH-Gruppen eingeführt. Mit diesem Indikator wird bei den Methoden von Weber (269) sowie Garry und Routh (78) AThCh als Substrat verwendet. Es sind sehr einfache und schnelle Methoden, die jedoch nicht spezifisch für die PsChE sind.
Um eine spezifische Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum durchzuführen, ist das BuThCh das geeignete Substrat.
Im folgenden werden die einzelnen Schritte beschrieben, die zur Entwicklung einer neuen photometrischen Bestimmungsmethode führten.

XI. Eigene Untersuchungen zur Entwicklung einer neuen Methode.

1. Die Methode von Weber - ihre Reproduzierbarkeit.

- Lösungen:

  A Puffer / Chromogen:

  0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,2

  0,00027 M DThbNBS

  B Substrat:

  0,062 M AThCh

  Die Lösungen sind bei 4°C in dunkler Flasche ca. sechs Wochen haltbar.

- Arbeitsweise:

  Verwendung von frischem, hämolysefreiem Serum.

  Messung bei 25°C; Filter = 405 nm; Schichtdicke 1 cm

Ansatz:
In Küvette pipettieren:

Lösung A	3,0 ml
Lösung B	0,1 ml
Serum	0,02 ml

Gut mischen, sofort Extinktion ablesen und Stoppuhr starten. Ablesung nach 1, 2 und 3 Minuten wiederholen.

o Berechnung:
Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute (ΔE/Min.) Mittelwert bilden.
Der molare Extinktionskoeffizient für den gelben Farbstoff unter Testbedingungen beträgt bei 405 nm 14 x 10^6 cm^2/Mol.

$$\text{ChE-Aktivität} = \Delta \text{ E/min} \times 11100 \text{ mE/ml}$$

a) Mit Enzympipetten werden Serumverdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 20 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Vom Serum und von jeder Verdünnung werden 0,02 ml zur Bestimmung eingesetzt.

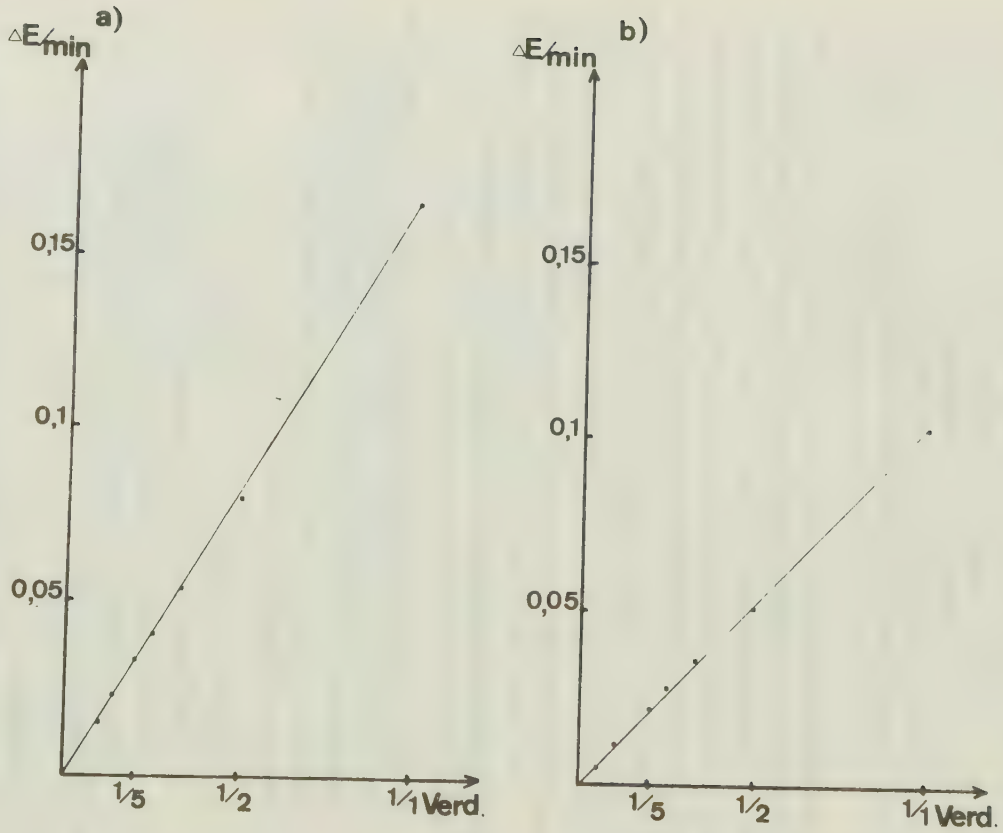
2. Untersuchungen über die Spezifität der PsChE-Bestimmung mit AThCh als Substrat.

Es wird nur Hämolyse angenommen, durch die EChE freigesetzt wird. Um Störeffekte zu vermeiden, wird nun die EChE ohne Serumbeimengungen über drei Minuten gemessen. Zum Vergleich dient die Bestimmung der PsChE-Aktivität nach Kalow und Genest (141) in einer Modifikation nach Richterich (228).

o Inkubationsbedingungen:

BeCh-Chlorid 5 x 10^{-5}M. Phosphatpuffer $^1/_{15}$ M, pH 7,4. Serum 0,02 ml. $\pm$ Dibucain 1,0 x 10^{-5}M. Temperatur 25°C, Wellenlänge 240 nm. Meßdauer über 3 Min., Schichtdicke 1 cm Quarzküvette.

o Lösungen:
BeCh-Chlorid 1 x 10^{-3}M:
24,4 mg BeCh-Chlorid mit $^1/_{15}$ M Phosphatpuffer nach Sørensen auf 100 ml. Gefroren aufbewahren.



b) Dasselbe mit automatischer Pipette für Serum. Ergebnisse siehe graphische Darstellung.

Dibucain-Lösung 4×10^{-4} M:
15,2 mg Nupercain (CIBA) werden mit $^1/_{15}$ M Phosphatpuffern nach Sørensen auf 100 ml gelöst. Gefroren aufbewahren.

Substratlösung:
2 Teile BeCh-Lösung + 38 Teile Puffer; jeden Tag frisch mischen.

Inhibitorlösung:
2 Teile BeCh-Lösung + 1 Teil Dibucainlösung + 37 Teile Puffer; jeden Tag frisch mischen.

o Ansätze:

	A	I	L
Substratlösung	3,0 ml	------	------
Inhibitorlösung	------	3,0 ml	3,0 ml
Serum	0,02 ml	0,02 ml	------

mit L auf Null einstellen, Extinktion A und I in 1 min.-Intervallen bei 240 nm ablesen.

o Berechnung:

$$IU = \Delta E/min \times 22880$$

$$DN = 100 - \frac{IU(I) \times 100}{IU(A)}$$

Normalwerte:

	$\bar{x} \pm 2s$	
	ChE	DN
Normale	559 - 1493 IU	62 - 90
Intermediärtyp	140 - 386 IU	30 - 60
Homozygote	unter 100 IU	unter 30

Versuchsbedingungen:

a) Es wird ein Serum mit beiden Methoden bestimmt (Doppelbestimmung).

b) Dieses Serum wird 1 : 6 (0,1 ml + 0,5 ml) mit 0,01 %iger Saponinlösung verdünnt und wie echtes Serum behandelt.

c) Citratblut wird zentrifugiert und das Plasma abgesaugt. Die Erythrozyten werden dreimal in physiologischer Kochsalzlö-

sung aufgeschwemmt und abzentrifugiert. Von diesen gewaschenen Erythrozyten werden 0,1 ml mit 0,5 ml 0,01 %iger Saponinlösung verdünnt und hämolysiert, dann wie Serum in die Bestimmung eingesetzt. (Doppelbestimmung)

d) Mit dem Hämolysat aus c) wird mit beiden Methoden ohne Substrat gemessen, um Fehlermöglichkeiten einer Reaktion freigesetzter Stoffe (z.B. Glutathion) aus den Erythrozyten mit dem Indikatorstoff in der Methode nach Weber auszuschließen. In der Methode nach Kalow erfolgt keine Reaktion solcher Stoffe, da ja hier das weggelassene Substrat direkt gemessen wird. Ergebnisse:

		Weber		Kalow	
		ΔE/min	$\overline{\Delta E}$/min	ΔE/min	$\overline{\Delta E}$/min
a	I	0,158		0,087	
	II	0,168	0,163	0,089	0,088
b	I	0,025		0,015	
	II	0,030	0,028	0,014	0,015
c	I	0,082		0,004	
	II	0,086	0,084	0,000	0,002
d	I	0,013		entfällt	
	II	0,015	0,014		

ΔE/min von d) muß von ΔE/min aus c) subtrahiert werden, um auf echte Werte für die Aktivität der EChE zu kommen. Die Aktivität von reiner EChE, bestimmt nach Weber, wäre:

0,070 x 11100 x 6 mE/ml = 4662 IU/ml

Dagegen wäre die Aktivität von 46 IU bei der Methode nach Kalow bei Normalwerten für Serum von 560 - 1500 IU praktisch Null. Die Bestimmung mit BeCh ist spezifisch für PsChE. Die Bestimmung mit AThCh ist unspezifisch. Die EChE ist pro ml Erythrozyten etwa zwei bis dreimal aktiver (4662 mE/ml) als normale PsChE pro ml Serum (a = 1810 mE/ml). Eine Störung der Reaktion durch Saponin ist nicht gegeben, wie aus b) hervor-

geht. Die erhaltenen Werte multipliziert mit 6 (Verdünnung), ergeben fast die Werte von a).

3. Untersuchungen über die Spezifität von S-Butyryl-Thiocholin-Jodid als Substrat im Vergleich zu Acetyl-Thiocholin-Jodid.

Versuchsbedingungen:

Bei der handelsüblichen Methode (s. oben) wird eine 0,062 M AThCh-Lösung verwendet. Das sind 2×10^{-3} M AThCh im Ansatz. Es wird 0,062 M BuThCh wie AThCh in diese Bestimmungsmethode eingesetzt.

0,1 ml Substratlösung zu 3 ml Puffer/Chomogen, dazu jeweils 0,02 ml Untersuchungslösung, umrühren und bei Durchgang des Zeigers am Photometer durch den Nullpunkt Stoppuhr starten und nach 1, 2, 3 min. Extinktion ablesen!

a) Es wird ein Normalserum eingesetzt, dann das Serum eines Blutspenders (Nummer 29777) und anschließend die Erythrozyten dieses Spenders.

a_I	a_{II}
BuThCh 0,062 M	AThCh 0,062 M
Nichtenzymatische Hydrolyse	
nach 3 min = o	nach 3 min = o
Normalserum	
1 min 2 min 3 min 0,338 0,677 1,002 Δ E/min = 0,334 = 3707 mE/ml	1 min 2 min 3 min 0,187 0,361 0,532 Δ E/min = 0,177 = 1965 mE/ml
Blutspenderserum (Vierfachbestimmung)	
ΔE/min = 0,366 = 4,063 mE/ml	Δ E/min = 0,203 = 2253 mE/ml
Erythrozyten des Blutspenders, wie unter 2) präpariert (Vierfachbestimmung)	

(a_I)	(a_{II})
Δ E/min = 0,025 = 1665 mE/ml Ery	Δ E/min = 0,101 = 6727 mE/ml Ery
Erythrozyten des Blutspenders ohne Substrat (Vierfachbestimmung).	
ΔE/min = 0,025 = 1665 mE/ml Ery	
Echte Aktivität der Erythrozytencholinesterase	
o mE/ml Ery	5062 mE/ml Ery

Ohne Substrat erfolgt eine Extinktionsänderung, die gleich der ist, die mit BuThCh als Substrat gemessen wurde. Somit kann man annehmen, daß BuThCh durch die EChE nicht umgesetzt wird. Mit AThCh wurde die Aktivität der Erythrozyten-Cholinesterase mit 5062 mE/ml, bezogen auf 1 ml Erythrozyten, bestimmt und ist damit etwa doppelt so hoch wie die Aktivität der PsChE (Serum) der gleichen Person, 2253 mE/ml bezogen auf 1 ml Serum. Die Aktivität der PsChE mit BuThCh als Substrat ist etwa doppelt so hoch wie die mit AThCh. Saponin 0,01%ig stört die Reaktion nicht, wie aus 2. zu ersehen ist.

b) Die Erythrozyten werden auf zwei verschiedene Weisen gewaschen und hämolysiert, dann wird wie a) bestimmt.

b_I	b_{II}
Die Vollblutmenge wird ermittelt.	Blut wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.
Diese Blutmenge wird mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 5 verdünnt und die Erythrozyten werden abzentrifugiert.	Die Erythrozyten werden abzentrifugiert und das Volumen bestimmt.

Der Überstand wird abgesaugt und erneut die Erythrozyten mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das gleiche nochmals, dann wird die Kochsalzlösung abgesaugt.	Absaugen des Überstandes und Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10, gewaschen und abzentrifugiert. Das gleiche nochmals.
Die Erythrozyten mit 0,01%-iger Saponinlösung auf das alte Blutvolumen aufgefüllt und hämolysiert.	Absaugen des Überstandes und Verdünnen 1 : 10 mit 0,01 %-iger Saponinlösung. Hämolysieren.
Dieses Hämolysat: Vollbluthämolysat mit Aqua dest. 1 : 10 verdünnt. Nochmaliges Verdünnen 1 : 10 mit Aqau dest., davon 0,1 ml in den Ansatz.	Das Hämolysat wird 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt und davon werden 0,1 ml in den Ansatz gegeben.

b_I			b_{II}		
5×10^{-3}M AThCh	3×10^{-3}M BuThCh	5×10^{-3}M BuThCh	5×10^{-3}M AThCh	3×10^{-3}M BuThCh	5×10^{-3}M BuThCh
im Ansatz!					
ohne Substrat Δ E/min = 0,003			ohne Substrat Δ E/min = 0,012		
Δ E/min = 0,019 - 0,003 = 0,016 = 368 mE/ml x 10 (Verd.) = 3680 mE/ml für Vollblut	Δ E/min = 0,005 - 0,003 = 0,002 = 46 mE/ml x 10 (Verd.) = 460 mE/ml für Vollblut	Δ E/min = 0,005 - 0,003 = 0,002 = 46 mE/ml x 10 (Verd.) = 460 mE/ml für Vollblut	Δ E/min = 0,050 - 0,012 = 0,038 = 874 mE/ml x 10 (Verd.) = 8740 mE/ml für Erythrocyten	Δ E/min = 0,014 - 0,012 = 0,002 = 46 mE/ml x 10 (Verd.) = 460 mE/ml für Erythrocyten	Δ E/min 0,015 - 0,012 = 0,003 = 69 mE/ml x 10 (Verd.) = 690 mE/ml für Erythrocyten

Somit wäre der Hämokrit dieser Person etwa 40, was ja durchaus der Norm entspricht. Das interessiert aber weniger als die Tatsache, daß die EChE mit AThCh als Substrat gegenüber BuThCh eine sehr hohe Aktivität hat. Mit BuThCh reagiert das Enzym kaum. Somit ist BuThCh ein selektives Substrat der PsChE. Siehe auch 145.

4. Untersuchungen mit Puffern, die für eine neue Methode geeignet erscheinen.

a) Zunächst soll die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von BuThCh durch die PsChE geprüft werden mit verschiedenen Puffern. Nach Einstellen der Puffer werden auf 100 ml jeweils 10 mg DThBNBS gelöst.

Ansätze:

3 ml Puffer-DThbNBs
0,1 ml 0,062 M BuThCh
0,02 ml Serum (versch.)

Die Angabe der Hydrolyse-Geschwindigkeit erfolgt in Δ E/min. Die Messung erfolgt vierfach über 3 min. Es wird $\overline{\Delta}$ E/min aus 12 Δ E/min ermittelt.

a)$_{I}$) M/15 Phosphatpuffer nach Sørensen.

Der Puffer wurde aus der Apotheke bezogen.

pH	$\overline{\Delta}$ E/min
7,1	0,271
7,2	0,288
7,3	0,287
7,4	0,296
7,5	0,300
7,6	0,323
7,7	0,317
7,8	0,317
7,9	0,329

a$_{II}$) M/10 Phosphatpuffer

$KH_2 PO_4$ 0,1 M + $Na_2 HPO_4$ 0,1 M (getrocknetes wasserfreies Salz wird verwendet).

Anderes Serum als für a_I)

pH	KH_2PO_4 0,1 M mit Na_2HPO_4 0,1 M auf 50 ml	$\overline{\Delta E}$/min
7,2	14,4 ml	0,330
7,3	12,0 ml	0,340
7,4	9,5 ml	0,353
7,5	8,0 ml	0,360
7,6	6,5 ml	0,355
7,75	5,0 ml	0,360
7,9	3,7 ml	0,362
8,0	2,6 ml	0,375

a_{III}) 0,15 M Phosphatpuffer

Anderes Serum als a_I) und a_{II})

pH	KH_2PO_4 0,15 M mit Na_2HPO_4 0,015 M auf 50 ml	$\overline{\Delta E}$/min
7,1	15,0 ml	0,282
7,21	12,5 ml	0,287
7,34	10,0 ml	0,290
7,47	8,0 ml	0,314
7,56	6,7 ml	0,319
7,65	5,4 ml	0,324
7,77	4,5 ml	0,323
7,8	3,8 ml	0,321

a_{IV}) Veronalnatrium/HCl-Puffer J = 0,001

pH	0,1 n HCl mit 0,1 m Veronal-Na auf 100 ml	$\overline{\Delta E}$/min	
		0,062 M BuThCh in 0,9%-igem NaCl	0,062 M BuThCh in Aqua bidest
7,4 (7,5)	41,8 ml	0,326	0,324
7,6 (7,7)	38,4 ml	0,357	0,366
7,8 (7,9)	33,8 ml	0,384	0,385
8,0 (8,1)	28,4 ml	0,394	0,392
8,2 (8,3)	23,1 ml	0,406	0,411
8,4	17,9 ml	0,411	0,414

Ab pH 8,0 ist die Puffer-DThbNBS-Lösung mit steigendem pH zunehmend gelb, was auf eine Veränderung von DThbNBS hinweist.
Die Reaktion im Veronal-Na/HCl-Puffer fällt nach drei Minuten so stark ab, daß dieser Puffer nicht geeignet ist.

a_{V}) TRIS-Puffer J = 0,1

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,0 M + 100 ml Salzsäure 1,0 M auf 1.000 ml aufgefüllt.
BuThCh 0,062 M in der Substratlösung, anderes Serum.

pH	ml TRIS 1,0 M mit 100 ml HCl 1,0 M auf 1.000 ml	$\overline{\Delta E}$/min
7,2	111 ml	0,171
7,4	118 ml	0,193
7,6	128 ml	0,206
7,8	144 ml	0,215
8,0	169 ml	0,225
8,2	208 ml	0,229
8,4	270 ml	0,243
8,6	367 ml	0,259
8,8	524 ml	0,282
9,0	761 ml	0,328

Auch hier zeigt sich vom pH 8,0 aufsteigend eine zunehmende Gelbfärbung der Puffer-DThbNBS-Lösung.

Für die Methode muß ein pH unter 8,0 gewählt werden.

Bei TRIS-Puffer J = 0,1 verläuft die Hydrolyse sehr konstant über die gemessene Zeit.

b) Vergleiche von Seite vorher getesteten Puffern mit dem gleichen Serum.

b_I) Phosphatpuffer I = 0,1, Phosphatpuffer J = 0,2

ml 0,5 M Na_2HPO_4 mit ml 0,5 M KH_2PO_4 auf 100 ml						
pH	Na_2HPO_4	KH_2PO_4	$\overline{\Delta E}$/min	Na_2HPO_4	KH_2PO_4	$\overline{\Delta E}$/min
7,2	57,8 ml	24,4 ml	0,302	119 ml	44,2 ml	0,301
7,4	60,8 ml	17,6 ml	0,325	124 ml	29,2 ml	0,319
7,6	62,8 ml	11,5 ml	0,346	127 ml	18,9 ml	0,318
7,8	64,2 ml	7,38 ml	0,346	129 ml	12,1 ml	0,342

b_{II}) Vergleich von drei Phosphatpuffern:

Geschwindigkeit der Hydrolyse, Konstanz der Geschwindigkeit über sechs Minuten

nach	0,1 M			J = 0,1		M/15
min	pH 7,4	7,5	7,6	pH 7,4	7,6	pH 7,2
1	0,311	0,323	0,330	0,314	0,347	0,292
2	0,310	0,325	0,330	0,317	0,346	0,292
3	0,302	0,310	0,316	0,312	0,341	0,291
4	0,301	0,310	0,314	0,309	0,336	0,287
5	0,295	0,304	0,312	0,305	0,329	0,280
6	0,285	0,297	0,301	0,297	0,319	0,284

Mit dem Phosphatpuffer J = 0,1 wird 0,062 M BuThCh in der Substratlösung am schnellsten hydrolysiert.

Die Abnahme der Geschwindigkeit in sechs Minuten ist abhängig von der Substratkonzentration und der Enzymkonzentration.

b_{III}) Vergleich von Veronal-Na/HCl-Puffer J = 0,001 mit pH 7,6 und Phosphatpuffer J = 0,1, pH 7,6.

Substratlösung: 0,062 M BuThCh in
einmal physiologischer Kochsalzlösung
und 0,062 M BuThCh in Aqua dest.

	Veronal-Na/HCl pH 7,6	Phosphat pH 7,6
mit NaCl	0,357	0,350
mit Aqua dest.	0,366	0,357

Kochsalz in der Substratlösung hemmt die Hydrolyse geringfügig.

b_{IV}) Serum aus b_{III}, Phosphatpuffer J = 0,1, pH 7,6.

Ansätze:		ml	ml	ml
Puffer - DThbNBS		3,0	3,0	3,0
0,062 M BuThCh		0,1	0,1	0,1
Serum		0,02	0,01	0,005
nach	1 min	0,347	0,174	0,095
	2 min	0,346	0,174	0,096
	3 min	0,341	0,175	0,097
	4 min	0,336	0,177	0,096
	5 min	0,329	0,173	0,097
	6 min	0,319	0,172	0,097
	7 min	------	0,171	0,095

Daraus geht hervor, daß bei sinkender Enzymkonzentration die Hydrolyse-Geschwindigkeit länger konstant bleibt. Bei einem Viertel der Menge werden die Werte ungenau, d.h., sie werden zu hoch, wahrscheinlich wegen der Schwierigkeit, 0,005 ml Serum zu pipettieren.

b $_{V}$) Vergleich Puffer J = 0,1, pH = 7,4 mit 0,010 ml Serum im Ansatz.

Zur Konstanz der Hydrolyse-Geschwindigkeit über zehn Minuten

min	Phosphat	TRIS
1	0,154	0,157
2	0,154	0,157
3	0,154	0,157
4	0,153	0,157
5	0,152	0,156
6	0,150	0,154
7	0,149	0,153
8	0,148	0,152
9	0,146	0,151
10	0,144	0,148

b $_{VI}$) TRIS-Puffer J = 0,1, pH = 7,4.

Abfall des pH während neun Minuten Hydrolyse.

Es wird die fünffache Menge Ansatz hergestellt und der pH ohne Serum nach 3,6 und 9 min gemessen.

Ansatz:

TRIS-DThbNBS 15 ml
0,062 M BuThCh 0,5 ml
mischen, messen + 0,1 ml Serum

min	o min	3 min	6 min	9 min
pH	7,4	7,39	7,36	7,34

Die Wasserstoffionen-Konzentration ist ca. 5 min konstant und fällt innerhalb 9 min unwesentlich ab.

5. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten.

Frisches Glutathion enthält pro Molekül eine freie SH-Gruppe. Diese reagiert unter Versuchsbedingungen quantitativ mit dem Indikator 5,5--Dithio-bis (2nitrobenzoesäure) zu dem zu messenden gelben Farbstoff 5-Mercapto-2nitrobenzoesäure und zwar setzt eine SH-Gruppe ein Mole-

kül frei.

o Lösungen:

Herstellen einer $3,1 \times 10^{-3}$ molaren Glutathionlösung:
95 mg Glutathion auf 100 ml Aqua dest. lösen.

Davon werden gelöst:

I. 10 ml auf 100 ml Aqua dest.
→ $3,1 \times 10^{-4}$M Glutathion

II. 20 ml auf 100 ml Aqua dest.
→ $6,2 \times 10^{-4}$M Glutathion

Herstellen verschiedener DThbNBS-Konzentrationen.

In Phosphatpuffer J = 0,1, pH = 7,4 wird gelöst:

a) 10 mg DThbNBS auf 100 ml = 0,00027 M
b) 20 mg DThbNBS auf 100 ml = 0,00054 M
c) 30 mg DThbNBS auf 100 ml = 0,00108 M

o Reaktionsbedingungen:

Phosphatpuffer J = 0,1; pH = 7,4
Temperatur = 25°C

Ablesen der Extinktionen bei λ = 405 nm 5 min nach Hinzugabe der Glutathionlösungen.

Eppendorf-Photometer:
Spalt = 7×12 mm^2
Ansatz:

3,0 ml	Puffer-DThbNBS (steigende Konzentrationen DThbNBS)
0,1 ml	verschiedene Konzentrationen Glutathion

mischen und nach fünf Minuten ablesen.
Die Bestimmungen werden dreifach durchgeführt.
Rechts und links sind dieselben Versuche an verschiedenen Tagen mit neuen Lösungen aufgetragen. Die Küvettenunterschiede wurden berücksichtigt. Ablesung erfolgt gegen Puffer-DThbNBS.

a) mit 0,0027 M DThbNBS

E_I = mit 1×10^{-4}M Glutathion im Ansatz
E_{II} = mit 2×10^{-4}M Glutathion im Ansatz

	1. Tag			2. Tag		
E_{aI} =	0,116	0,117	0,118	0,121	0,120	0,123
E_{aII} =	0,246	0,251	0,248	0,257	0,253	0,256
ΔE_a =		0,132			0,134	
$\overline{\Delta E_a}$ =		0,133				

b) mit 0,00054 DThbNBS

E_{bI} =	0,103	0,109	0,109	0,112	0,113	0,117
E_{bII} =	0,231	0,242	0,243	0,251	0,247	0,246
ΔE_b =		0,131			0,134	
$\overline{\Delta E_b}$ =		0,1325				

c) mit 0,00108 DThbNBS

E_{cI} =	0,110	0,111	0,113	0,116	0,117	0,119
E_{cII} =	0,244	0,245	0,248	0,254	0,249	0,249
ΔE_c =		0,135			0,134	
$\overline{\Delta E_c}$ =		0,1345				

Aus allen drei Bestimmungsansätzen wird der Mittelwert errechnet:

$$\overline{\Delta E} = 0,133$$

Dabei ist 1×10^{-5}M Glutathion zur Reaktion gekommen. Der molare Extinktionskoeffizient bei 405 nm für 5-Mercapto-2-nitrobenzoesäure ist:

$$\varepsilon = \frac{E}{Gm \times d} \qquad d = 1 \text{ cm} \quad E = 0,133 \quad C = 1 \times 10^{-5} \text{Mol/l}$$

$$\boxed{\varepsilon = 13,3 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^2}$$

Damit kommen wir auf etwas niedrigere Farbentwicklung als bei der Ent-

wicklung der handelsüblichen Methode nach Weber. Wir hatten kein sogenanntes "naszierendes" Glutathion zur Verfügung. Jedoch wurden diese Werte nach erstmaligem Öffnen des verschlossenen Röhrchens erhalten. Wir verwenden weiterhin den oben ermittelten Extinktionskoeffizienten, da Weber in seiner Arbeit den gleichen Wert fand (269).

Damit ist die PsChE - Aktivität wie folgt zu berechnen:

$$U/ml = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon \times d} \times 10^6 \times \frac{EV}{AV} \qquad \left[\mu Mol \times ml^{-1} \times min^{-1}\right]$$

6. Untersuchungen über das Verhältnis zwischen Substrat-Konzentration und Spaltungsgeschwindigkeit durch PsChE mit BuThCh als Substrat.

a) Mit 0,02 ml Serum im Ansatz

Bedingungen:

Phosphatpuffer J = 0,1, pH = 7,6
0,00054 M DThbNBS (20 mg/100 ml Puffer)

Als Anfangsgeschwindigkeit wird ΔE/min in der ersten Minute ermittelt, 30 sec nach Mischen mit dem Serum.

Ansatz:

3 ml	Puffer DThbNBS
0,1 ml	steigende Substratkonzentration
0,02 ml	Serum

Mischen, nach 30 sec Extinktion ablesen oder Zeiger durch Nullpunkt laufen lassen und Stoppuhr in Gang setzen. Nach einer Minute Extinktion ablesen.
Doppelbestimmung.

Berechnung:

$$U/ml = (312 : 13,3) \times \Delta E/min$$

S = BuThCh	$1/S$	ΔE/min	V = U/ml	$1/v$	S/v
2×10^{-5}M	50 000	0,090	1,056	0,947	$1,8 \times 10^{-5}$
4×10^{-5}M	25 000	0,120	1,407	0,711	$2,8 \times 10^{-5}$

S = BuThCh	1/S	ΔE/min	V = U/ml	1/v	S/v
$7,7 \times 10^{-5}$M	12 987	0,151	1,770	0,565	$4,35 \times 10^{-5}$
$1,5 \times 10^{-4}$M	6 667	0,179	2,099	0,476	$7,1 \times 10^{-5}$
3×10^{-4}M	3 333	0,217	2,545	0,393	$11,7 \times 10^{-5}$
6×10^{-4}M	1 667	0,276	3,237	0,309	$18,5 \times 10^{-5}$
$1,3 \times 10^{-3}$M	769	0,323	3,789	0,264	$34,3 \times 10^{-5}$
$2,5 \times 10^{-3}$M	400	0,359	4,211	0,237	$59,3 \times 10^{-5}$
5×10^{-3}M	200	0,365	4,281	0,234	$116,7 \times 10^{-5}$
1×10^{-2}M	100	0,388	4,551	0,220	$219,7 \times 10^{-5}$
2×10^{-2}M	50	0,396	4,645	0,215	$430,5 \times 10^{-5}$

b) Mit einer Serumverdünnung 1 : 10, davon 0,1 ml im Ansatz. Sonst Bedingungen wie a).

Berechnung:

U/ml = (320 : 13,3) x ΔE/min

S = BuThCh	1/S	ΔE/min	V = U/ml	1/v	S/v
1×10^{-5}M	100 000	0,019	0,457	2,188	$2,1 \times 10^{-5}$
$2,5 \times 10^{-5}$M	40 000	0,037	0,890	1,124	$2,8 \times 10^{-5}$
5×10^{-5}M	20 000	0,061	1,468	0,681	$3,4 \times 10^{-5}$
1×10^{-4}M	10 000	0,089	2,141	0,467	$4,6 \times 10^{-5}$
$2,5 \times 10^{-4}$M	4 000	0,122	2,935	0,341	$8,5 \times 10^{-5}$
5×10^{-4}M	2 000	0,146	3,513	0,285	$14,2 \times 10^{-5}$
1×10^{-3}M	1 000	0,165	3,970	0,252	$25,1 \times 10^{-5}$
2×10^{-3}M	500	0,187	4,499	0,222	$44,4 \times 10^{-5}$
$3,33 \times 10^{-3}$M	300	0,197	4,740	0,211	$70,2 \times 10^{-5}$
5×10^{-3}M	200	0,209	5,029	0,199	$99,4 \times 10^{-5}$
1×10^{-2}M	100	0,228	5,486	0,182	$182,2 \times 10^{-5}$

c) Mit 0,1 ml einer Serumverdünnung 1 : 10

Bedingungen:

TRIS-Puffer J = 0,1 pH = 7,4

0,00027 M DThbNBS (10 mg/100 ml Puffer)

Ansätze:

3,0 ml	Puffer DThbNBS
0,1 ml	fallende Substratkonzentration
0,1 ml	Serumverdünnung 1 : 10

Die Messung erfolgt zweifach 30 sec nach Serumzugabe über 30 sec. Die Werte werden addiert; so läßt sich Δ E/min bestimmen.

S = BuThCh	$^1/_S$	$\Delta E/_{min}$	v = U/ml	$^1/_v$	$^S/_v$
2×10^{-2}M	50	0,261	6,280	0,159	$318,4 \times 10^{-5}$
1×10^{-2}M	100	0,248	5,967	0,168	$167,5 \times 10^{-5}$
8×10^{-3}M	125	0,241	5,798	0,172	$137,9 \times 10^{-5}$
6×10^{-3}M	167	0,235	5,654	0,177	$106,1 \times 10^{-5}$
4×10^{-3}M	250	0,223	5,365	0,186	$74,5 \times 10^{-5}$
2×10^{-3}M	500	0,204	4,908	0,204	$40,7 \times 10^{-5}$
1×10^{-3}M	1 000	0,184	4,427	0,226	$22,5 \times 10^{-5}$
8×10^{-4}M	1 250	0,178	4,238	0,233	$18,6 \times 10^{-5}$
6×10^{-4}M	1 667	0,170	4,090	0,244	$14,6 \times 10^{-5}$
4×10^{-4}M	2 500	0,152	3,657	0,273	$10,9 \times 10^{-5}$
2×10^{-4}M	5 000	0,130	3,128	0,320	$6,3 \times 10^{-5}$
1×10^{-4}M	10 000	0,100	2,406	0,416	$4,1 \times 10^{-5}$
8×10^{-5}M	12 500	0,090	2,165	0,462	$3,6 \times 10^{-5}$
6×10^{-5}M	16 667	0,078	1,877	0,533	$3,1 \times 10^{-5}$
4×10^{-5}M	25 000	0,060	1,444	0,692	$2,7 \times 10^{-5}$
2×10^{-5}M	50 000	0,036	0,866	1,155	$2,3 \times 10^{-5}$

d) Puffer wie c)

Ansatz:

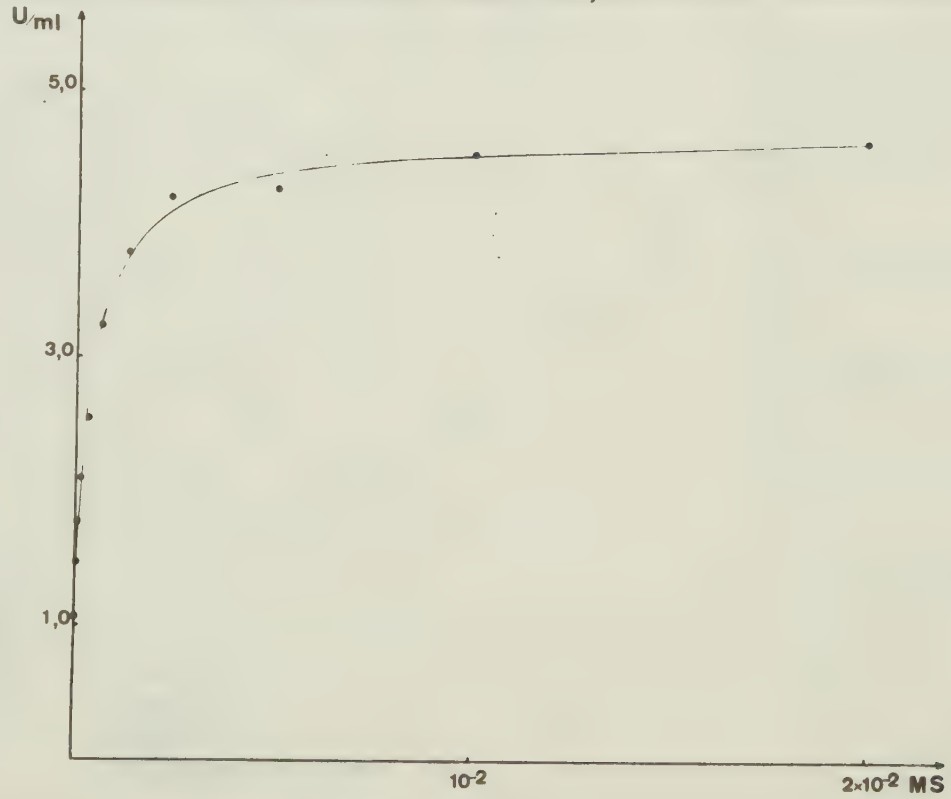
3,1 ml	Puffer DThbNBS wie c) steigende Substratkonzentrationen
0,1 ml	Serumverdünnung 1:10

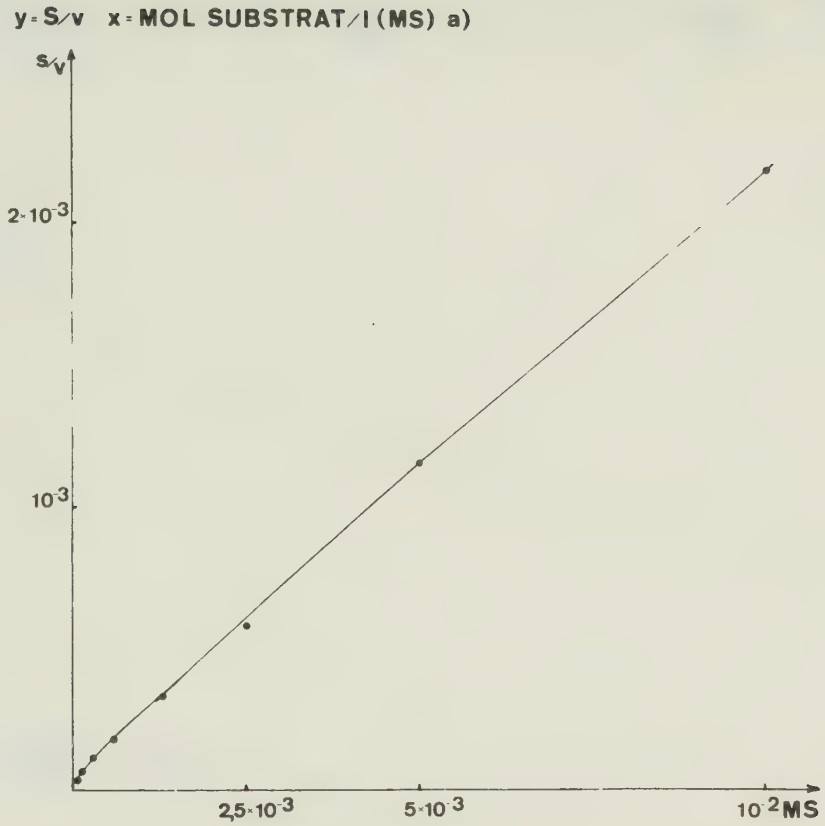
S = BuThCh	$^1/_S$	$\Delta E/$ min	v = U/ml	$^1/_v$	S/v
1×10^{-4}M	10 000	0,106	2,55	0,392	$3,9 \times 10^{-5}$
5×10^{-4}M	2 000	0,172	4,14	0,241	12×10^{-5}
1×10^{-3}M	1 000	0,196	4,72	0,212	21×10^{-5}
5×10^{-3}M	200	0,238	5,73	0,174	87×10^{-5}
1×10^{-2}M	100	0,256	6,16	0,162	162×10^{-5}
2×10^{-2}M	50	0,268	6,43	0,156	311×10^{-5}

o Graphische Darstellung der Ergebnisse:

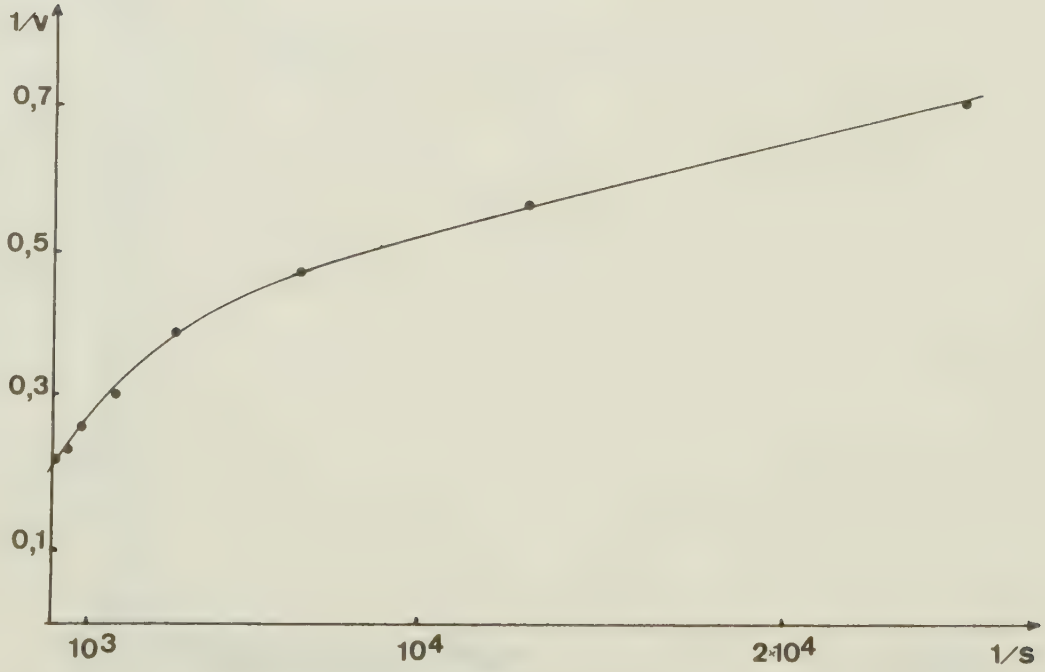
AKTIVITÄTS-pS-KURVE
S-BuThCh
Serum a
U ml
5,0
3,0
1,0
1
3
5
pS

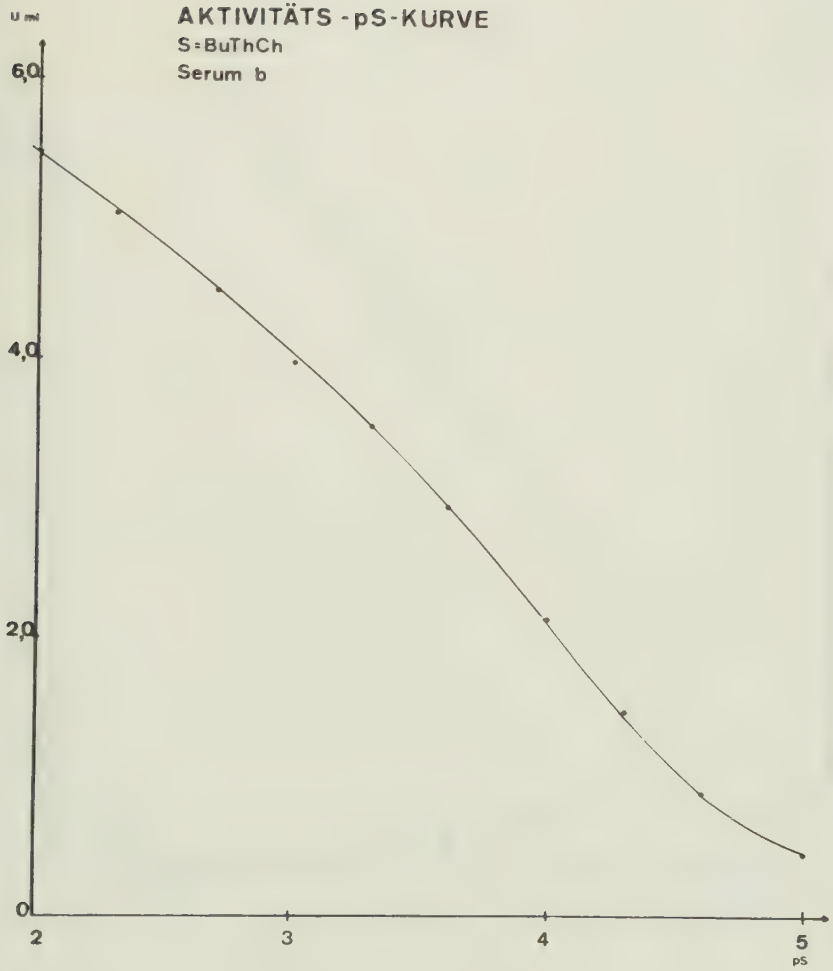
ENZYM-SUBSTRAT-BEZIEHUNG, LINEAR a)

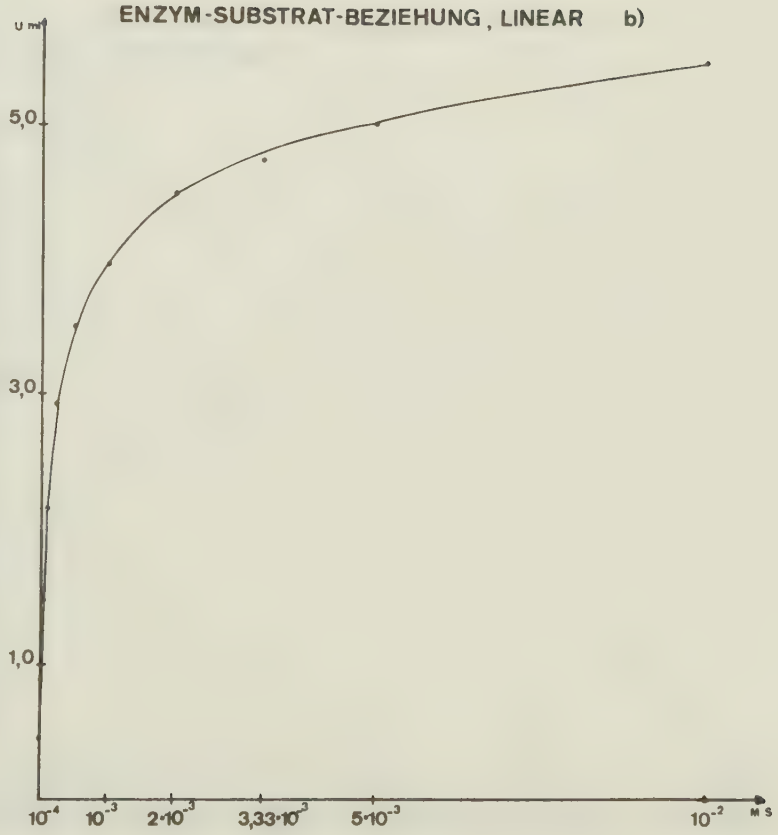


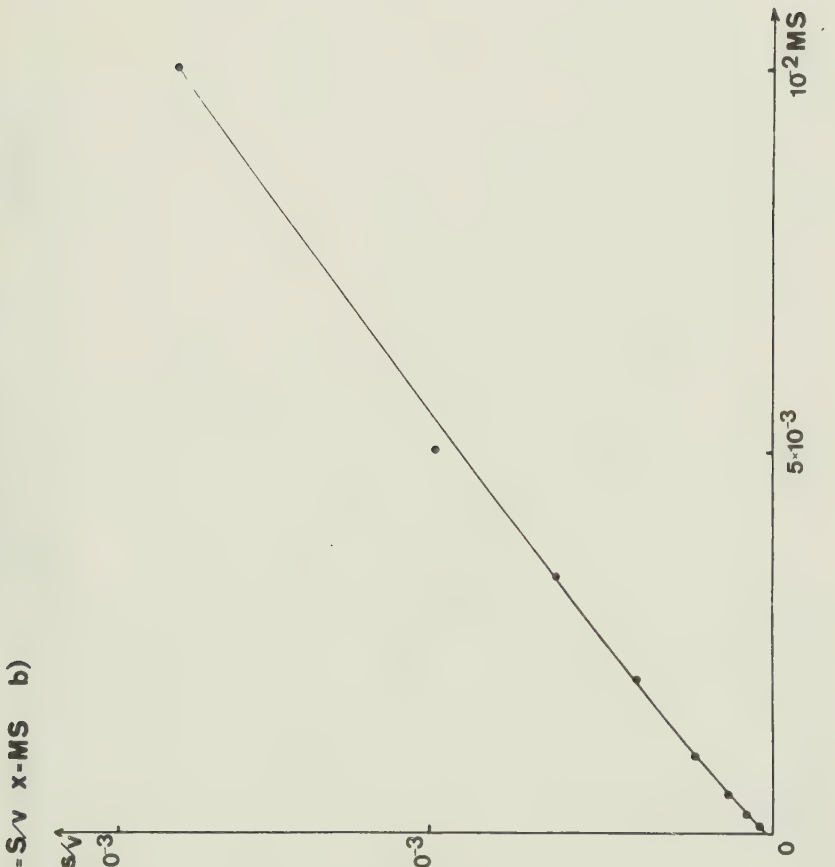

y = S/v x = MOL SUBSTRAT/l (MS) a)
S/v
2·10-3
10-3
2,5·10-3
5·10-3
10-2MS

y = 1/V x = 1/S a)

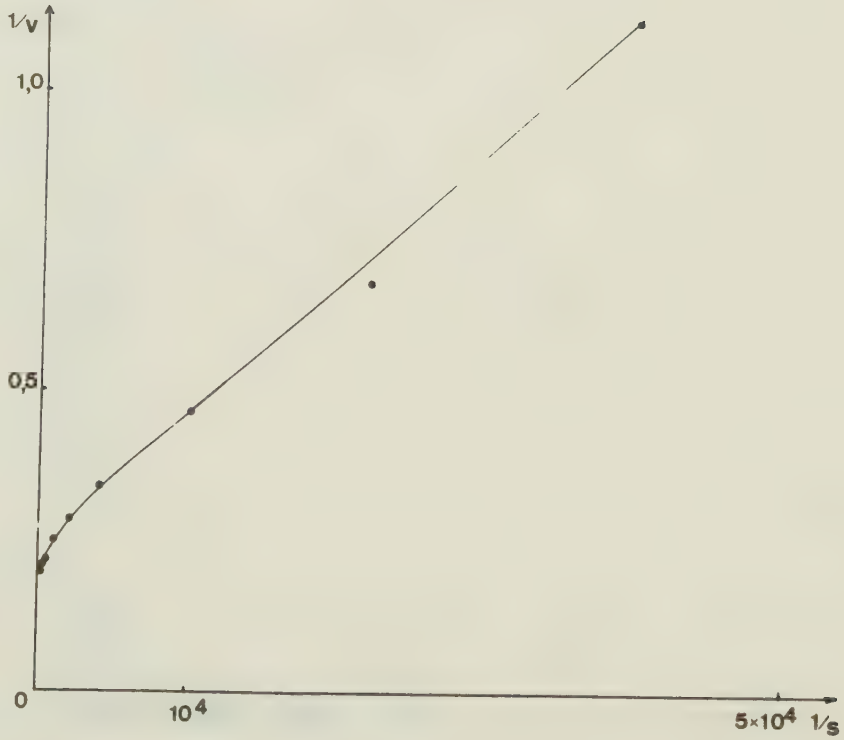


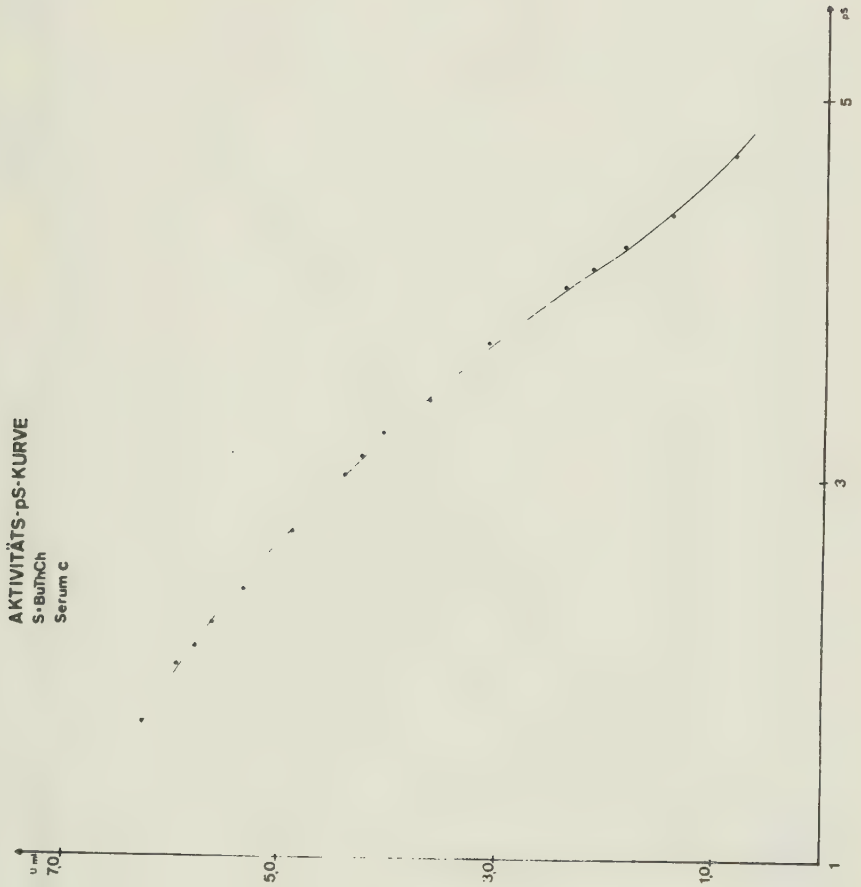

AKTIVITÄTS - pS - KURVE
S = BuThCh
Serum b
U ml
6,0
4,0
2,0
0
2
3
4
5
pS

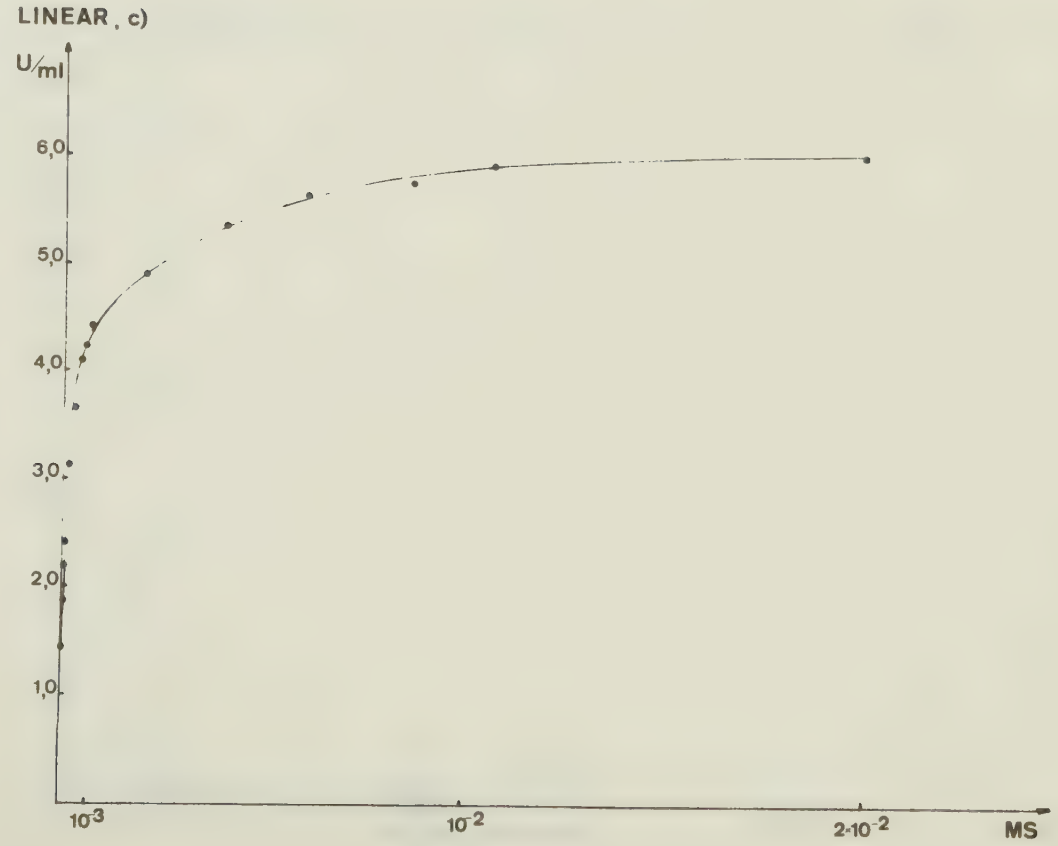

ENZYM-SUBSTRAT-BEZIEHUNG , LINEAR b)
U ml
5,0
3,0
1,0
10⁻⁴
10⁻³
2·10⁻³
3,33·10⁻³
5·10⁻³
10⁻²
M S


y=S/v x-MS b)
S/v
2·10⁻³
10⁻³
0
5·10⁻³
10⁻²MS

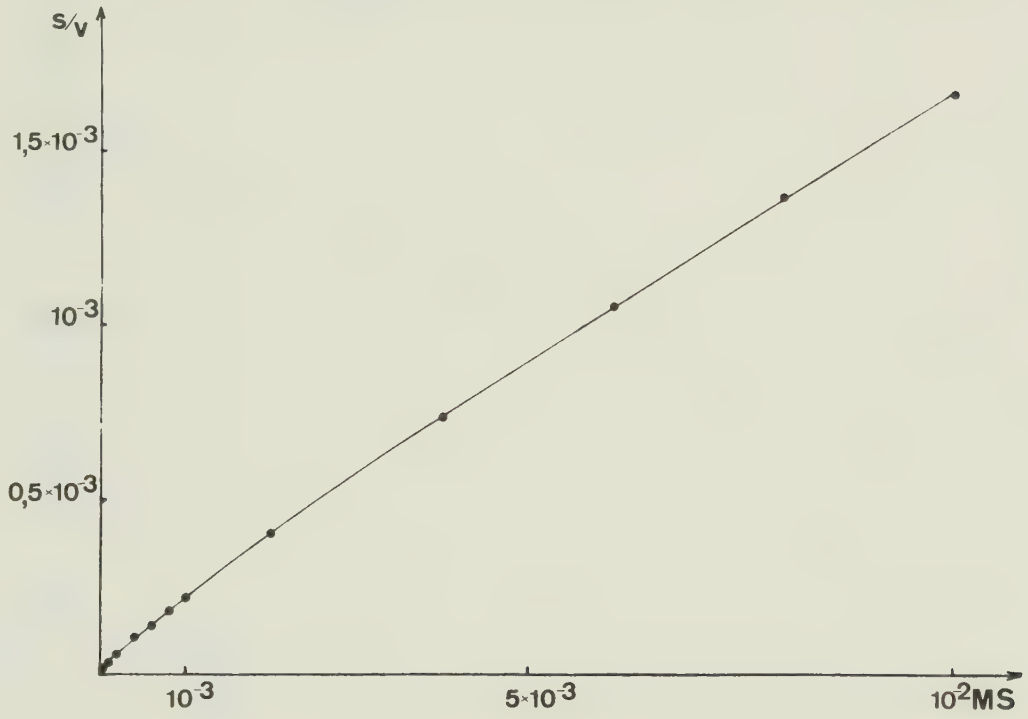
y=1/v x=1/S b)

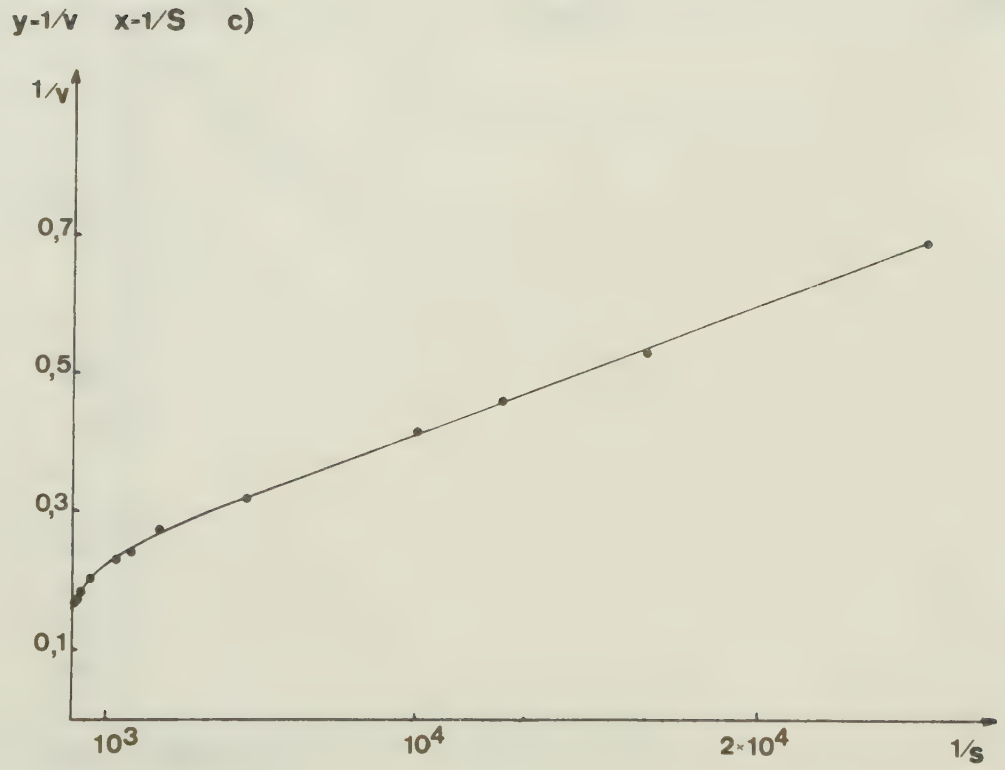


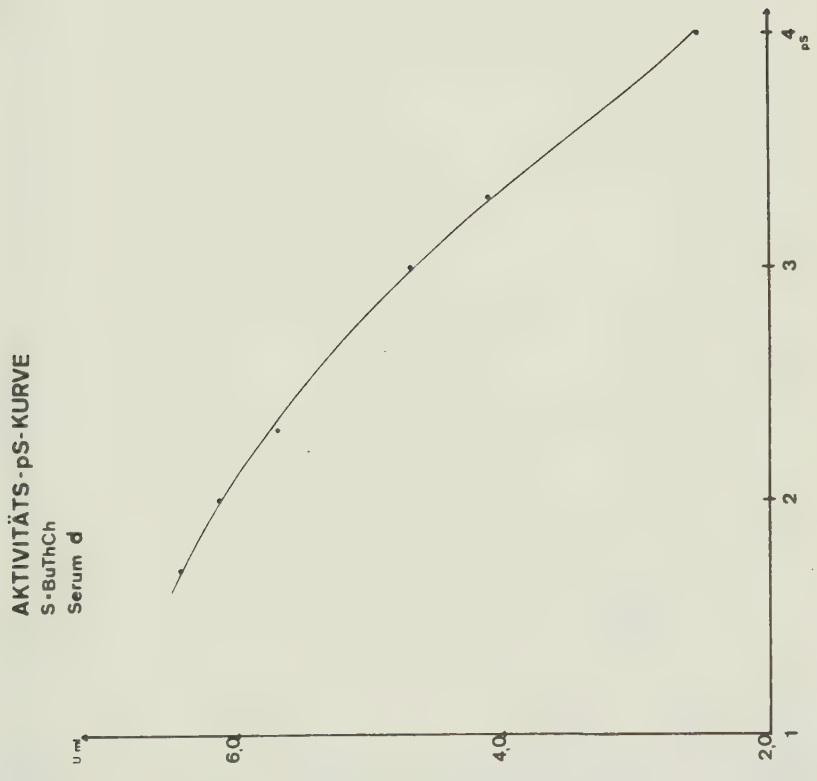

AKTIVITÄTS-pS-KURVE
S-BuChCh
Serum c
U/ml
7.0
5.0
3.0
1.0
1
3
5
pS

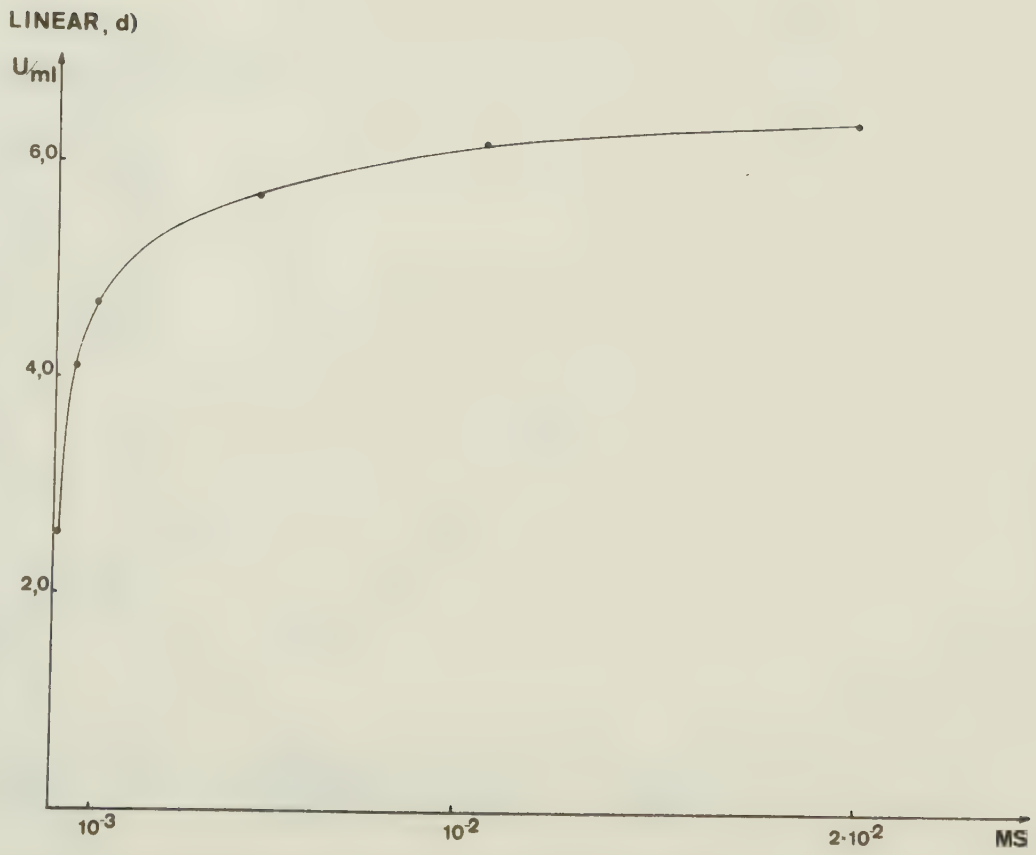

LINEAR , c)
U/ml
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
10-3
10-2
2·10-2
MS

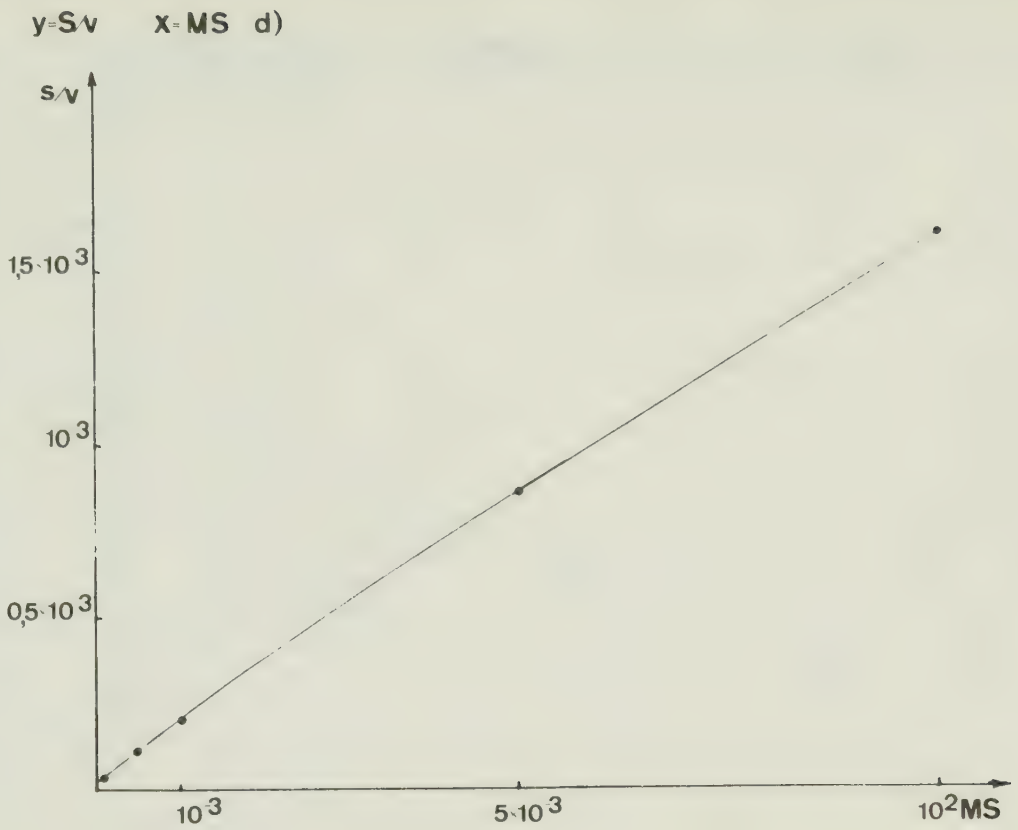
y = S/v x = MS c)



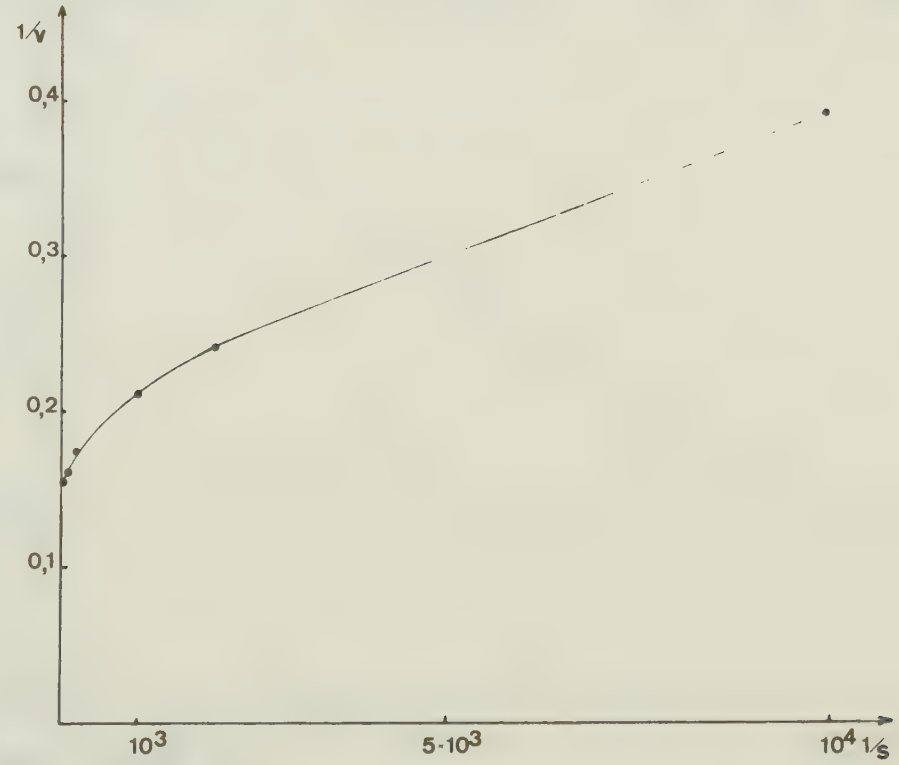

y-1/v x-1/S c)
1/v
0,7
0,5
0,3
0,1
10^3
10^4
2·10^4
1/s


AKTIVITÄTS-pS-KURVE
S-BuThCh
Serum d
U ml
6,0
4,0
2,0
1
2
3
4
pS


LINEAR, d)
U/ml
6,0
4,0
2,0
10-3
10-2
2·10-2
MS


y=S/v x=MS d)
s/v
1,5·10 3
10 3
0,5·10 3
10 3
5·10 3
10 2MS

Y=1/V X=1/S d)



7. Diskusskon der Ergebnisse unter 4. und 6.

Nach der Gleichung von Michaelis und Menten (Biochem. Z. 49, 333, 1913) müssen die graphischen Zuordnungen Geraden ergeben, die I. die Abszisse bei $-{}^{1}/_{K_M}$, die Ordiante bei ${}^{1}/V$ max. und II. die Abszisse bei $-K_M$, die Ordiante bei K_M/V max. schneiden und die Steigungen I. $K_M \times V$ max., II. ${}^{1}/V$ max. aufweisen. PsChE aus menschlichem Serum - steigenden BuThCh-Konzentrationen ausgesetzt - gehorcht nach obiger Darstellung nicht diesem Gesetz. Die Kurven knicken gegen Null hin ab. Eine genaue Michaelis-Konstante ist demnach für BuThCh als Substrat nicht anzugeben. Werden die Hydrolyse-Raten gleich V gegen -log [BuThCh] aufgetragen, so erhält man leicht s-förmige Kurven. Die Geschwindigkeit steigt kontinuierlich mit der Konzentration. Sehr deutlich sieht man die Substratabsättigung des Enzyms, wenn linear zugeordnet wird. Für die Methode ist eine Substratkonzentration geeignet, die im oberen Bereich dieser Kurve liegt. Fällt die BuThCh-Konzentration z.B. von 4×10^{-3}M auf 2×10^{-3}M, so erfolgt eine Änderung der Hydrolysegeschwindigkeit von 9%, von 4×10^{-5}M auf 2×10^{-5}M aber um 40%. Wir wählen eine Substratkonzentration von 5×10^{-3}M. Eine höhere Konzentration bringt keinen Vorteil. Da der Preis des Substrats nicht gerade niedrig ist, würde das die Methode nur verteuern. Bei der sehr hohen PsChE-Aktivität von 10 U/ml würden 10 µl Serum 1,0 µMol Substrat in 10 min umsetzen. Die Konzentration von 5×10^{-3}M in dem Ansatz von 2,7 ml würde auf $4,63 \times 10^{-3}$M sinken. Hierbei sinkt die Hydrolyse-Rate unwesentlich. Auch die Konzentration der DThbNBS reicht aus, um eine Reaktionsdauer von ca. 15 min konstant zu erhalten. Die Wahl des Puffers und der Wasserstoffionenkonzentration ist einfach, da die gebräuchlichen Phophatpuffer gut geeignet sind und die enzymatische Hydrolyse der PsChE nicht beeinflussen. Höher konzentrierte Phosphatpuffer scheinen das Enzym etwas zu hemmen.

Ordiante	Abszisse
I. ${}^{1}/V$	${}^{1}/V$
II. ${}^{S}/V$	S

Wir werden einen 0,05 molaren Phosphatpuffer wählen, der etwa dem mit der Ionenstärke von 0,1 entspricht.
Die Herstellung von TRIS-Puffer ist etwas umständlich. Wir werden diesen trotz der guten Eigenschaften bei den Versuchen und seiner guten bakteriziden Wirkung nicht verwenden.

DThbNBS und BuThCh zersetzen sich allmählich unter Lichteinwirkung und bei Zimmertemperatur.
Die Pufferlösung ist nicht mehr zu verwenden, wenn sie einen stark gelben Farbton hat. Substratlösung ist unbrauchbar, wenn beim Pipettieren in den Puffer eine Gelbfärbung eintritt. Ansonsten halten sich die Lösungen im Kühlschrank gut.

Beim Herstellen der BuThCh-Lösung ist darauf zu achten, daß das Substrat trocken ist; wenn dies nicht der Fall ist, muß es im Exsiccator wasserfrei gemacht werden, sonst werden die Konzentrationen des Substrats je nach Wassergehalt verschieden eingewogen. Die Wasserstoffionenkonzentration wird mit pH = 7,2 gewählt. Im neutralen Bereich puffert Phosphat am besten. Das pH-Optimum der PsChE liegt viel höher.
Etwa bei pH um 7,8 stellten wir bei fast allen Untersuchungen mit Puffern ein Plateau fest. Da aber bei pH = 8 eine zunehmende Zersetzung der DThbNBS einsetzt, ist die Methode in diesem pH-Bereich nicht durchführbar.
Die folgenden Versuche werden demnach unter diesen Bedingungen gemacht:

2,5 ml	Phosphatpuffer 0,05 M, pH 7,2 / DThbNBS 0,00027 M
0,1 ml	0,135 M BuThCh (= 5×10^{-3} M im Ansatz)
	zum Vergleich 3×10^{-3} M im Ansatz
0,1 ml	Serumverdünnung 1 : 10

Gut mischen, beim Durchgang des Zeigers am Photometer am Nullpunkt Stoppuhr starten; beim Durchgang des Zeigers durch E = 0,1 abstoppen.
Die ermittelte Sekundenzahl wird wie folgt in U/ml umgerechnet:

$$U_{/ml} = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon \times d} \times 10^6 \quad \frac{EV}{AV}$$

$$\Delta E_{/min} = \frac{60 \times 0,1}{t} \quad \frac{sec}{sec}$$

$$\Delta E_{/min} = \frac{6}{t}$$

$$U_{/ml} = \frac{6 \times 10^6 \times 270}{13,3 \times 10^6 \times t} \quad \left[\mu Mol \times ml^{-1} \times Min^{-1}\right]$$

$$\text{PSChE - Aktivität} = \frac{121,8}{t} \quad U/ml$$

8. Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Methode, über die Abhängigkeit von der Temperatur und über die Konstanz der Reaktion.

a) Ein Serum wird mehrmals verdünnt und die Aktivität gemessen. (Doppelbestimmung)

Verdünnung	E	3×10^{-3}M BuThCh	5×10^{-3}M BuThCh
1 : 10	0 - 0,1	24 sec 24 sec = 5,08 U/ml	23 sec 23 sec = 5,21 U/ml
1 : 30	0 - 0,05	25 sec 25 sec = 2,44 U/ml	24 sec 24 sec = 2,54 U/ml
1 : 50	0,02	25 sec 25 sec = 0,97 U/ml	25 sec 25 sec = 1,0 U/ml
1 : 100	0 - 0,01	26 sec 26 sec = 0,47 U/ml	25 sec 25 sec = 0,49 U/ml

Die Methode ist gut reproduzierbar.

b) Ein Serum mit normaler und ein Serum mit niedriger Aktivität werden bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

E = 0 - 0,2 (!!)

°C	20	25	30	35	40
S 1	57 sec = 4,27 U/ml	42 sec = 5,8 U/ml	37 sec = 6,6 U/ml	30 sec = 8,1 U/ml	27 sec = 9,0 U/ml
S 2	95 sec = 2,56 U/ml	73 sec = 3,3 U/ml	62 sec = 3,9 U/ml	52 sec = 4,7 U/ml	47 sec = 5,2 U/ml

Bei einer Änderung von 20°C auf 40°C steigt die Aktivität um ca. 50% an. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, bei der Aktivitätsbestimmung genau die Temperatur von 25°C einzuhalten.

c) Ein Serum wird zur Bestimmung angesetzt. Beim Durchgang des Zeigers durch den Nullpunkt der Photometerskala werden zwei Stoppuhren gestartet. Beim Durchgang des Zeigers durch E = 0,1 wird eine

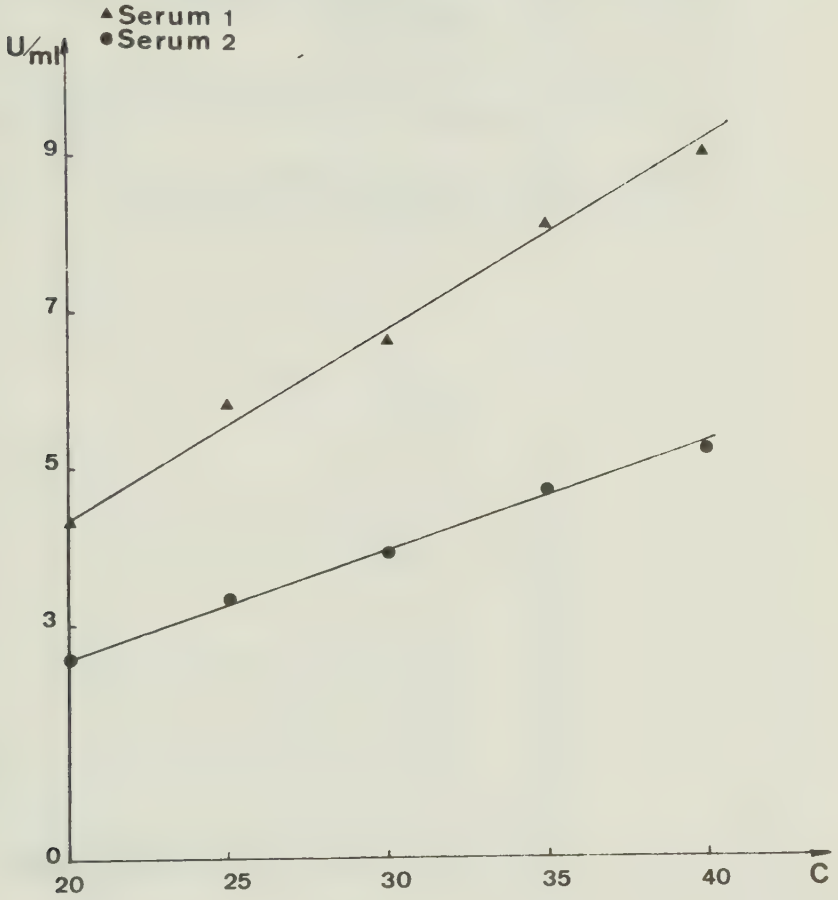
eine Stoppuhr gestoppt = Aktivität bei 0 min.
Nach 3, 6 und 10 min erneute Messung (Doppelbestimmung)

Min	3×10^{-3}M BuThCh		5×10^{-3}M BuThCh	
0	23 sec	23 sec	22,5 sec	22,6 sec
3	23 sec	23 sec	22,0 sec	22,2 sec
6	24 sec	24 sec	23,0 sec	23,2 sec
10	25 sec	25 sec	23,6 sec	23,5 sec

Die Reaktion bleibt über mehr als 10 min konstant mit einem Geschwindigkeitsverlust von ca. 4% bei 5×10^{-3}M BuThCh und mit 5% bei 3×10^{-3}M BuThCh.

Bei PsChE-Aktivitäten, die sehr niedrig sind, wird der Verlust noch sehr viel kleiner sein.

Einfluß der Temperatur auf die PsChE-Aktivität mit Substrat BuThCh:



9. Untersuchungen zur Bestimmung der Dibucainzahl.

Obwohl zu diesem Zeitpunkt kein Serum mit einer atypischen PsChE zur Verfügung steht, wird vorläufig die Konzentration Dubucain bestimmt, die ausreicht, um auf Werte für die Dibucainzahl zu kommen, die mit der Methode nach Kalow bestimmt wurden.

a) Ermittlung der Dibucainkonzentration die zur 70% - 80%-igen Hemmung der normalen PsChE nötig ist.

Dazu werden 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 mg Dibucain auf 100 ml Puffer-DThbNBS gelöst. Davon werden 10 ml auf 100 ml aufgefüllt.
Drei Seren werden bei 3 x und 5 x 10^{-3}M BuThCh doppelt bestimmt. Dann werden die Hemmzahlen bestimmt.

(Tabelle umseitig)

Dibucain mg/l ↓ →	Serum (A)				Serum (B)				Serum (C)			
	3×10^{-3}M BuThCh		5×10^{-3}M BuThCh		3×10^{-3}M BuThCh		5×10^{-3}M BuThCh		3×10^{-3}M BuThCh		5×10^{-3}M BuThCh	
E = 0-0,1	25,7 sec		24,5 sec		37,6 sec		34,8 sec		38,0 sec		35,2 sec	
16	25,8 sec	80	18,0 sec	73	34,0 sec	78	25,4 sec	73	36,8 sec	79	27,0 sec	74
17	27,1 sec	81	19,2 sec	74	36,9 sec	80	26,6 sec	74	40,1 sec	81	28,2 sec	75
18	28,1 sec	82	19,2 sec	74	40,1 sec	81	27,3 sec	75	41,2 sec	82	28,7 sec	75
19	29,6 sec	83	20,1 sec	76	41,9 sec	82	28,7 sec	76	41,7 sec	82	30,5 sec	77
20	30,8 sec	84	20,2 sec	76	42,0 sec	82	28,8 sec	76	44,2 sec	83	31,5 sec	78
21	32,3 sec	84	21,8 sec	78	43,7 sec	83	30,1 sec	77	44,2 sec	83	31,9 sec	78
22	33,3 sec	84	22,2 sec	78	45,7 sec	84	32,3 sec	78	46,5 sec	84	32,9 sec	79
23	33,5 sec	85	22,7 sec	78	46,1 sec	84	32,8 sec	79	50,2 sec	85	33,5 sec	79
24	34,7 sec	85	23,1 sec	79	48,5 sec	84	32,8 sec	79	51,0 sec	85	34,4 sec	80
25	35,3 sec	85	24,5 sec	80	48,7 sec	85	35,0 sec	80	51,2 sec	85	36,6 sec	81

für D N E = 0 - 0,02

Hierbei sieht man deutlich, wie die Hemmung der PsChE-Aktivität bei steigender Substratkonzentration und gleicher Konzentration Hemmstoff abnimmt, ein Kriterium für kompetitive Hemmung.

b) Zwei Seren werden bei 3 x 10^{-3}M BuThCh mit 17, 17,5 und 18 mg Dibucain pro Liter, sowie bei 5 x 10^{-3}M BuThCh mit 24,5, 25 und 25,5 mg Dibucain pro Liter mit den Werten verglichen, die nach Kalow bestimmt wurden.

	E = 0-0,02							
3 x 10^{-3}M BuThCh	E = 0 - 0,1	Dibucain / l						
		17 mg		17,5 mg		18 mg		
SI	49 sec	50 sec	80	50 sec	80	53 sec	82	
SII	56 sec	57 sec	80	58 sec	81	58 sec	81	
5 x 10^{-3}M BuThCh	E = 0 - 0,1	Dibucain / l						
		24,5 mg		25 mg		25,5 mg		
SI	47 sec	46 sec	80	46 sec	80	47 sec	80	
SII	52 sec	51 sec	80	52 sec	80	52 sec	80	
Kalow	E = 0 - 0,2	E = 0 - 0,01						
SI	42 sec	121 sec	83					
SII	48 sec	103 sec	77					

Damit liegen die Dibucainzahlen mit BuThCh als Substrat etwas zu hoch.

c) Drei Seren werden bei 3 x 10^{-3}M BuThCh mit 14 mg Dibucain pro Liter und bei 5 x 10^{-3}M BuThCh mit 19 mg Dibucain pro Liter verglichen mit den Werten aus der Methode nach Kalow.

3 x 10^{-3}M BuThCh	---------- E = 0 - 0,2	14 mg D/l E = 0, - 0,05	Dibucainzahl (DN)
SI	58 sec	59 sec	75
SII	49 sec	50 sec	75
SIII	115 sec	116 sec	75
5 x 10^{-3}M BuThCh	---------- E = 0 - 0,2	19 mg D/l E = 0 - 0,05	
SI	53 sec	55 sec	76
SII	47 sec	44 sec	73
SIII	112 sec	90 sec	69

(Fortsetzung n.Seite)

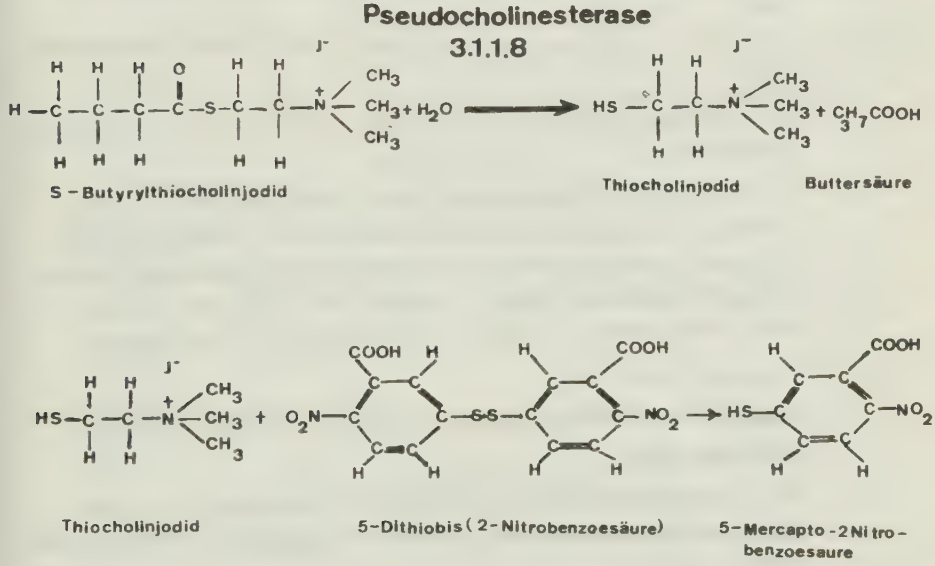
Kalow	Δ E/min	HemmungΔE/min	DN
SI	0,040	0,010	75
SII	0,046	0,009	80
SIII	0,011	0,003	73

Somit stehen 19 mg Dibucain/l für die Bestimmung der Dibucainzahl fest. Die Werte sind vorläufig, bis ein Serum mit atypischer PsChE gefunden wird.

Die Methode wird wie folgt zur Bestimmung von Normalwerten angewendet:

10. Die Methode zur Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum und zur Ermittlung der Dibucainzahl.

o Prinzip:



PsChE hydrolysiert unter standartisierten Bedingungen BuThCh-Jodid. Das freiwerdende Butyrat wird von einem Phosphatpuffer abgefangen. Das ThCh-Jodid reagiert mit dem SH-Gruppen-Indikator 5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoat). Es entsteht 5-Mercapto-2-Nitrobenzoat, ein gelber Farbstoff, der bei Wellenlänge 412 nm ein Absorptionsmaximum hat und dessen Konzentration bei Wellenlänge 405 nm gemessen wird.

o Reagentien:

1. S-Buthyrylthiocholin-Jodid (Fluka)
2. 5,5-Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) (EGA-Chemie)
3. Dibucainhydrochlorid (Nupercain CIBA)
4. Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)
5. Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)

Lösungen:

o A) Buthyrylthiocholin-Jodid 0,135 M:

128 mg trockenes BuThCh-Jodid werden in 3 ml Aqua bidest. gelöst.
Die Lösung ist in dunkler Flasche bei $4^{o}C$ über sechs Wochen haltbar.

B) 0,05 M Phosphat-Puffer / 0,00025 M 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat bestehend aus:

5,253 g Na_2HPO_4 (wasserfreies Salz, vorher bei $120^{o}C$ 1 - 2 Std. trocknen); 1,77 g KH_2PO_4 (wasserfreies Salz, vorher bei $120^{o}C$ 1 - 2 Std. trocknen); 100 mg 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat in Aqua bidest. lösen und auf 1000 ml auffüllen, bei $25^{o}C$ pH 7,2; die Lösung ist in dunkler Flasche bei $4^{o}C$ über sechs Wochen haltbar.

C) Dibucain 5×10^{-5}M

Dibucain wird mit Diäthyläther entwässert, filtriert, getrocknet und eingewogen:

19 mg in 1 000 ml der Lösung B gelöst. Die Lösung ist wöchentlich frisch herzustellen und in dunkler Glasflasche im Kühlschrank aufzubewahren.

D) Serumverdünnung 1 : 10:

0,1 ml Serum werden mit 0,9 ml Aqua bidest. verdünnt. (Kein

0,9%iges NaCl verwenden!)

o Arbeitsweise:

Zur Bestimmung der PsChE im Serum sind erforderlich:
Ein Photometer mit Filter 405 nm, mit heizbarem Küvetten-Halter. Ein Wasserbad von 25°C mit Küvettenkühlung. Stoppuhr.
Die Temperatur von 25°C muß während der Messung genau eingehalten werden. Schichtdicke = 1 cm.

I. PsChE-Aktivität:

	Makromethode	Mikromethode
	in Küvette pipett.	in Reaktionsgef. pipett.
Lösung B	2,5 ml	0,5 ml
Lösung A	0,1 ml	0,02 ml
Serum verd. D	0,1 ml	0,02 ml
	mit Spatel mischen	schütteln und in Küvette gießen.
	Bei Durchgang des Zeigers am Photometer durch den Nullpunkt Stoppuhr starten, bei Durchgang des Zeigers durch E = 0,1 abstoppen. Ergibt: t.	

o Berechnung:

$$U/ml = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon \times d} \times 10^6 \times \frac{EV}{AV} \left[\mu Mol \times Min^{-1} \times ml^{-1}\right]$$

$$\varepsilon = 13,3 \times 10^{-6}\ cm^2/Mol$$

$$U/ml = \Delta E/min \times \frac{270}{13,3} \left[\mu/Mol \times Min^{-1} \times ml^{-1}\right]$$

$$\text{PsChE-Aktivität} = \frac{121,8}{t}\ U/ml$$

t = Sekunden für ΔE von 0,1

II. Bestimmung der Dibucainzahl (DN):

	Markomethode in Küvette pipett.	Mikromethode in Reaktionsgefäß pipett.
Lösung C	2,5 ml	0,5 ml
Lösung A	0,1 ml	0,02 ml
Serum verd. D	0,1 ml	0,02 ml
	mit Spatel mischen	schütteln und in Küvette gießen.
	Bei Durchgang des Zeigers am Photometer durch den Nullpunkt Stoppuhr starten, bei Durchgang durch E = 0,02 abstoppen. Ergibt: t_H	

o Berechnung:

Hemmung der PsChE in %:

$$\text{Dibucainzahl (DN)} = 100 - \frac{20 \times t}{t_H}$$

11. Die Ermittlung der Normalwerte:

Es werden 50 Personen untersucht, die gesund sind und noch nie eine Lebererkrankung durchgemacht haben. Die Untersuchten waren nüchtern, was aber keine Verschiebung der Normalwerte zur Folge hat, da dieser Faktor die PsChE-Aktivität eines Individuums nicht beeinflußt (44).

Die Seren werden dreimal mit der Makro- und dreimal mit der Mikromethode bestimmt. Aus diesen drei Werten wird der Mittelwert in der Berechnung der Normalwerte eingesetzt.

Ergebnisse:

				Makro		Mikro	
Name, Vorname		Geschl.	Alter	U/ml	DN	U/ml	DN
1. Böt.	Ral.	m	25 J.	3,9	73	4,1	73
2. Lop.	Her.	w	34 J.	6,1	76	5,8	74
3. Her.	Chr.	w	22 J.	5,5	74	5,5	74
4. Tau.	Hei.	w	23 J.	3,4	74	3,4	74
5. Kup.	Hei.	w	23 J.	4,7	75	4,7	73
6. Buy.	Mer.	w	19 J.	4,5	74	4,7	73

				Makro		Mikro	
Name, Vorname		Geschl.	Alter	U/ml	DN	U/ml	DN
7. Mat.	Jut.	w	30 J.	6,4	76	6,4	73
8. Oes.	Ros.	w	27 J.	3,7	75	3,8	71
9. Kah.	Det.	m	23 J.	5,1	73	5,3	71
10. Kom.	Wal.	w	24 J.	3,7	74	3,7	72
11. The.	Bri.	w	23 J.	4,1	73	4,2	72
12. Wag.	Ann.	w	29 J.	4,5	74	4,9	75
13. Fre.	Chr.	w	29 J.	3,6	74	3,8	74
14. Kor.	Tra.	w	26 J.	5,1	75	5,8	77
15. Lin.	Rud.	m	22 J.	4,2	73	4,5	73
*(16. Sch.	Ren.	w	27 J.	2,3	63	2,4	63)
17. Gol.	Sch.	w	23 J.	4,4	74	4,4	72
18. Kir.	Hil.	w	22 J.	4,2	75	4,1	71
19. Wür.	Han.	w	36 J.	3,8	74	3,8	73
20. Bau.	Chr.	w	17 J.	4,5	75	4,4	72
21. Kel.	Olg.	w	19 J.	4,5	74	4,7	74
22. Frö.	Ede.	w	29 J.	3,8	73	3,9	73
23. Kra.	Ulr.	w	21 J.	4,4	74	4,5	74
24. Reg.	Jos.	m	24 J.	4,7	75	4,7	73
25. Hep.	Jos.	m	63 J.	3,3	75	3,3	73
26. Hec.	Kar.	m	65 J.	3,9	77	4,1	74
27. Wie.	Sie.	m	30 J.	4,7	76	4,7	74
28. Bau.	Jos.	m	50 J.	5,8	75	6,1	73
29. Sla.	Max	m	66 J.	4,7	77	4,9	76
30. Ung.	Alo.	m	13 J.	5,5	75	5,5	74
31. Rei.	Kar.	m	36 J.	5,5	75	5,5	74
32. Blü.	Geo.	m	51 J.	5,5	76	5,1	75
33. Woh.	Cla.	w	22 J.	4,4	74	4,4	73
34. Bus.	Ann.	w	32 J.	3,5	73	3,6	73
35. Wok.	Ant.	m	46 J.	3,8	74	3,9	73
36. Sch.	Ado	m	37 J.	4,7	75	4,9	73
37. Kar.	Kar.	m	63 J.	3,5	74	3,7	73
38. Wei.	Gün.	m	25 J.	4,4	76	4,5	73
39. Sch.	Geo.	m	65 J.	2,7	75	2,7	75
40. Gra.	Fra.	m	57 J.	3,3	75	3,5	75

*(siehe 17.

Name, Vorname	Geschl.	Alter	Makro U/ml	Makro DN	Mikro U/ml	Mikro DN
41. Bri. Erw.	m	31 J.	7,2	78	7,2	76
42. Chr. Bur.	m	27 J.	7,6	75	7,6	73
43. Gru. Joh.	m	68 J.	6,4	76	6,4	73
44. Bak. Iva	m	28 J.	5,1	76	5,1	73
45. Mei. Hel.	m	23 J.	5,5	74	5,8	73
46. Poc. Erw.	m	41 J.	5,3	74	5,5	74
47. Sch. Kar.	m	34 J.	3,8	74	3,9	73
48. Ven. Ger.	m	40 J.	6,4	75	6,4	75
49. Wal. Con.	m	38 J.	4,7	74	4,7	73
50. Wis. Erh.	m	28 J.	6,1	75	6,1	73

o Berechnung:

Das Serum Nr. 16 wurde später als Intermediärtyp für die atypische PsChE erkannt und nicht zur Berechnung herangezogen.
Das Verhältnis von weiblichen und männlichen Untersuchten ist ausgewogen und beträgt 21 w : 28 m.
Das Durchschnittsalter ist etwas zu niedrig, doch wird die minimale Senkung der PsChE-Aktivität im Alter nur mit einer viel größeren Population sichtbar. Die Normalwerte für die Mikromethode liegen - nicht signifikant - etwas höher gegenüber der Makromethode, was auf die kleinen pipettierten Mengen zurückzuführen ist. Die im allgemeinen bei der Mikromethode um 1 - 2% niedrigere Hemmung mit Dibucain gegenüber der Makromethode ist darauf zurückzuführen, daß sich das Dibucainhydrochlorid leicht an Plastikoberflächen - hier an den Wänden der Reaktionsgefäße - anlagert und somit etwas niedrigere Konzentrationen in der Lösung entstehen.

Die Normalewerte werden nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - N \bar{x}^2}{N - 1}}$$

	Makromethode	Mikromethode
N	49	49
$\bar{x}$	4,680 U/ml	4,777 U/ml
s	1,064 U/ml	1,044 U/ml
$\bar{x} \pm 2\,s$	2,6 - 6,8 U/ml	2,7 - 6,9 U/ml
DN	73 - 78	71 - 77

Somit lassen sich die Normalwerte für beide Arbeitsweisen wie folgt angeben:

$\bar{x} = 4,7$ U/ml
$\bar{x} \pm 2\,s = 2,6 - 6,9$ U/ml
DN = 70 - 80

12. Andere Bedingungen:

Für die PsChE-Aktivitäts-Bestimmung mit 6×10^{-3}M BuThCh bei pH 7,7 werden 2,0 ml Puffer-DThbNBS-Lösung eingesetzt. Dazu kommen 0,1 ml BuThCh-Lösung und 0,01 ml Serum.
Es werden 10 Seren unter den unter 10. beschriebenen und den jetzigen Bedingungen untersucht.

Serum	pH 7,2 5×10^{-3}M BuThCh		pH 7,7 6×10^{-3}M BuThCh	
1	23 sec	5,3 U/ml	16 sec	6,0 U/ml
2	20 sec	6,1 U/ml	14 sec	6,8 U/ml
3	24 sec	5,1 U/ml	17 sec	5,6 U/ml
4	19 sec	6,4 U/ml	13 sec	7,3 U/ml
5	29 sec	4,3 U/ml	20 sec	4,8 U/ml
6	22 sec	5,5 U/ml	15 sec	6,4 U/ml
7	161 sec	0,76 U/ml	115 sec	0,83 U/ml
8	21 sec	5,8 U/ml	13 sec	7,3 U/ml
9	21 sec	5,8 U/ml	15 sec	6,3 U/ml
10	27 sec	4,5 U/ml	20 sec	4,8 U/ml
	$\bar{x}$ =	4,96 U/ml	$\bar{x}$ =	5,6 U/ml

Die Werte liegen um 13% höher. Das stimmt gut überein mit den Normal-

werten der bereits konfektioniert verfügbaren Methode, die bei ca. 2 500 gesunden Personen um 15% höher gefunden wurden, als unter 11. beschrieben.

13. Beschreibung des Testverfahrens, das zur Zeit bereits konfektioniert verfügbar ist.

Damit die klinische Prüfung der Methode, die im folgenden untersucht werden soll, allgemein verwertbar wird, benützen wir nicht die unter 10. angegebene Methode, sondern die bereits im Handel verfügbare. Es sind lediglich die Bedingungen etwas geändert, wodurch sich jedoch auch andere Normbereiche ergeben.

a) Monotest Cholinesterase*)

In einem Testglas sind enthalten:

0,02 M Phosphatpuffer pH = 7,7
0,006 M S-Butyrylthiocholinjodid
0,25 m M 5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)

Aus einem Gemisch lyophilisert sind diese Reagentien im Kühlschrank ca. ein Jahr lang haltbar.

o Arbeitsweise:

Wasserbad 25°C mit heizbarem Küvettenhalter.
Filter = 405 nm, Schichtdicke = 10 mm. Stoppuhr.

In Testglas pipettieren:

Aqua bidest. (25°C)	2,0 ml
Serum	0,01 ml

Kräftig schütteln und in Küvette gießen. Zeit abstoppen, in der die Extinktion um 0,1 zunimmt. Man kann zwei bis drei Küvetten hintereinander füllen und ablesen, da die Reaktion selbst ca. 10 Minuten konstant bleibt.

o Berechnung:

$$\text{PsChE-Aktivität} = \frac{90,7}{t} \quad \text{U/ml}$$

*) Merckotest Cholinesterase (Kinet. Test) Art. Nr. 3325

b) Kinetischer Test Cholinesterase + (40 Bestimmungen)

- Reagentien: wie oben
- Lösungen:

A) Substratlösung:

0,12 M S-Butyrylthiocholin

Es werden 5 ml Aqua bidest. in das mit Substrat bezeichnete Glas gegeben. Die Lösung ist ca. sechs Wochen im Kühlschrank haltbar.

B) Pufferlösung:

0,02 M Phosphatpuffer pH = 7,7
0,025 m M 5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)

Diese Reagentien werden in 100 ml Aqua bidest gelöst und sind dann in dunkler Flasche ca. sechs Wochen im Kühlschrank haltbar.

- Arbeitsweise:

wie a)

in Küvette pipettieren:

Pufferlösung (25°C)	2,0 ml
Substratlösung	0,1 ml
Serum	0,01 ml

Mit einem Spatel gut mischen, dann die Zeit abstoppen, in der die Extinktion um 0,1 zunimmt.

- Berechnung:

$$\text{PsChE-Aktivität} = \frac{95,2}{t} \text{ U/ml}$$

- Normalwerte:

Die Normalwerte wurden durch die Untersuchung von 2 500 gesunden Personen ermittelt.

$$\bar{x} \pm 2s = 3,0 - 8,0 \text{ U/ml}$$

Diese Methode wird zur klinischen Prüfung angewandt.

+ Merckotest Cholinesterase (Kinet.Test) Art.Nr. 3337

14. Klinische Prüfung der neuen Bestimmungsmethode der PsChE mit BuThCh als Substrat.

Anhand einiger Fälle wird die neue Methode erprobt. Wir untersuchten akute Hepatitiden, chronische Hepatitiden, Lebercirrhosen, Herzinsuffizien und einige Einzelfälle, auch Vergiftungen mit Parathion.

a) Akute Hepatitis:

Der Verlauf der akuten Hepatitis wird bei sieben Patienten klinisch-chemisch kontrolliert. Es konnte nicht bei allen täglich Blut entommen werden.
Zum Vergleich werden Verlaufskontrollen bei drei Patienten mit histologisch gesicherter chronischer Hepatitis mit Übergang in Cirrhose gegenübergestellt.

Ergebnisse:

(Tabelle umseitig)

Akute Hepatitis, Cor. Stef., 21 J. w.

	ChE	SGOT	SGPT	LDH	GlDH	SDH	APh	Bili	Thym.	GE	CAF - Elektrophorese				
											Alb.	α_1	α_2	ß-	γ-Glob.
	U/ml	mE/ml	mE/ml	mE/ml	mE/ml	mE/ml	mE/ml	mg %	MLE	g%	%	%	%	%	%
27.3.1969	3,2	295,0	355,0	126,0	6,3	2,4	49,0	8,1	4,4	8,25	51,8	4,2	8,2	11,8	23,0
28.3.1969	3,4	455,0	435,0	143,0	7,5	2,5	51,0	8,1	3,7	7,5	53,6	4,2	7,5	11,0	21,7
29.3.1969	2,7	196,0	335,0	221,0	7,5	7,7	53,0	8,4	3,2	7,3	54,4	3,2	7,9	12,0	21,0
30.3.1969	2,8	132,0	527,0	169,0	7,0	6,3	45,0	7,3	2,7	6,85	55,0	3,2	7,3	10,8	22,7
31.3.1969	2,9	75,0	196,0	84,0	0,8	1,0	61,0	5,1	2,2	7,6	54,0	4,0	8,5	12,0	20,5
1.4.1969	3,0	11,7	15,7	143,0	2,0	3,3	51,0	5,4	2,6	7,7	52,8	3,4	7,4	12,4	22,2
2.4.1969	3,2	35,5	88,3	100,0	2,1	0,7	37,0	3,8	2,0	7,1	52,7	3,7	7,3	11,0	24,0
4.4.1969	2,9	15,7	49,5	67,0	0,8	0,5	35,0	2,2	1,6	5,9	55,0	3,0	8,0	11,0	20,0
5.4.1969	3,5	15,7	43,5	84,0	0,2	0,5	50,0	2,4	2,6	6,7	47,5	3,0	10,0	12,0	23,0
6.4.1969	3,5	11,7	29,5	117,0	0,1	1,7	33,0	1,7	2,3	6,9	46,5	3,0	8,0	13,0	24,0
7.4.1969	3,5	17,6	23,5	92,0	0,4	1,9	40,0	1,9	4,0	8,1	48,0	3,0	9,0	12,0	22,0
8.4.1969	3,65	7,9	15,5	84,0	0,5	0,8	28,0	1,5	2,1	7,4	51,0	4,0	9,0	11,0	21,0
9.4.1969	3,64	7,8	7,8	84,0	0,4	0,8	29,0	1,5	1,7	---	55,5	3,0	9,0	13,0	19,0
16.4.1969	3,85	7,8	11,7	84,0	0,1	0,7	29,0	1,0	1,8	8,0	57,0	3,8	8,0	11,0	19,0

Akute Hepatitis, Gör. Bay., m.

	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	GlDH mE/ml	SDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1- %	α_2- %	ß- %	γ-Glob. %
31.3.1969	3,0	124,0	235,0	----	----	----	92,0	----	----	--	--	--	--	--	--
1.4.1969	3,4	196,0	235,0	229,0	11,8	14,8	116,0	16,4	4,2	6,7	51,5	4,0	8,5	12,0	22,0
2.4.1969	3,7	196,0	176,0	169,0	6,8	3,0	93,0	13,3	4,2	6,15	52,0	4,0	9,0	11,5	23,0
3.4.1969	3,2	235,0	196,0	134,0	6,8	8,4	104,0	13,2	4,2	6,8	47,5	5,0	11,0	11,5	22,5
4.4.1969	2,2	169,0	176,0	96,0	6,3	8,4	98,0	12,0	6,3	4,3	49,0	3,0	8,0	10,0	24,0
5.4.1969	3,0	117,0	196,0	134,0	7,3	5,1	137,0	10,3	7,4	4,6	49,0	3,0	8,0	11,0	25,0
6.4.1969	3,37	157,0	255,0	186,0	9,5	6,9	126,0	8,4	9,0	6,7	50,0	5,0	7,0	10,0	25,0
7.4.1969	3,6	196,0	216,0	160,0	7,3	5,9	100,0	7,4	7,1	5,7	47,0	4,0	7,0	11,0	23,0
8.4.1969	3,7	176,0	335,0	160,0	5,0	2,4	118,0	7,9	7,6	7,6	46,0	2,5	9,0	11,0	28,0

Akute Hepatitis, Rei. Kar., w.

12.2.1969	3,0	684,0	706,0	----	----	----	64,0	14,2	----	--	--	--	--	--	--
17.2.1969	3,78	----	117,0	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
24.2.1969	3,63	----	31,4	----	----	----	----	2,7	----	--	--	--	--	--	--
17.3.1969	3,94	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--

Akute Hepatitis, Fra. Man, m.

26.3.1969	5,1	415,0	537,0	203,0	2,5	1,4	114,0	12,5	2,2	6,6	59,0	3,5	8,5	11,5	15,5
27.3.1969	4,8	475,0	475,0	203,0	1,2	21,0	108,0	16,3	2,8	7,0	58,0	4,0	6,8	11,4	17,0
28.3.1969	4,8	728,0	557,0	169,0	1,9	24,6	106,0	16,3	2,2	6,75	59,2	3,8	9,3	12,2	15,5
29.3.1969	5,1	578,0	475,0	256,0	9,6	11,2	110,0	17,6	3,3	6,5	56,0	4,5	8,5	12,5	16,5
30.3.1969	4,6	557,0	495,0	168,0	14,0	11,3	99,0	15,9	3,3	6,4	62,0	3,8	7,4	9,8	17,0
31.3.1969	4,5	475,0	536,0	126,0	6,9	3,4	110,0	13,9	2,5	6,95	51,8	5,4	11,0	13,6	16,4
1.4.1969	4,1	274,0	235,0	117,0	7,3	4,4	98,0	10,3	1,9	5,9	56,8	4,5	8,2	12,4	16,6
2.4.1969	4,4	335,0	314,0	109,0	5,3	2,0	77,0	6,5	1,8	7,4	59,2	4,0	9,2	12,8	12,0
4.4.1969	3,46	196,0	235,0	75,0	1,3	2,0	85,0	6,7	1,4	4,9	60,0	4,0	7,0	11,0	15,0
5.4.1969	4,9	274,0	274,0	134,0	6,3	5,4	88,0	6,6	2,2	5,2	59,0	4,0	7,0	12,0	16,0
6.4.1969	5,4	314,0	235,0	151,0	4,4	5,1	61,0	4,4	3,2	5,7	53,0	4,0	8,0	13,0	16,0
7.4.1969	4,4	274,0	295,0	117,0	2,9	4,4	73,0	4,4	1,8	6,6	57,5	5,0	7,0	11,5	14,5
10.4.1969	5,5	335,0	274,0	143,0	3,4	6,3	75,0	3,9	1,8	--	--	--	--	--	--
17.4.1969	5,5	68,0	107,0	92,0	1,7	1,5	54,0	2,9	1,3	7,1	61,5	3,0	6,0	12,0	14,0

Akute Hepatitis, Ser. Sie., m.

	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	GlDH mE/ml	SDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %
3.2.1969	2,67	415,0	475,0	347,0	15,5	15,8	----	16,05	----	--	59,0	2,0	5,0	8,0	26,0
7.2.1969	----	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
13.2.1969	1,97	235,0	355,0	186,0	5,8	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
19.2.1969	3,0	235,0	475,0	177,0	8,6	1,2	56,0	3,7	----	--	--	--	--	--	--
21.2.1969	3,0	235,0	415,0	185,0	7,6	----	----	1,9	----	--	--	--	--	--	--
5.3.1969	3,5	17,6	68,4	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
7.3.1969	3,2	15,7	51,6	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
12.3.1969	3,6	11,7	31,4	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
17.3.1969	3,7	21,6	15.7	----	10,0	----	38,0	----	----	--	--	--	--	--	--
19.3.1969	4,1	9,8	11,7	----	----	----	34,0	----	----	--	--	--	--	--	--
20.3.1969	3,8	5,9	11,7	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
21.3.1969	3,8	5,9	11,7	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
23.3.1969	3,8	13,7	11,7	117,0	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--

Akute Hepatitis, Kar. Hel., 4 J. m.

28.3.1969	2,5	394,0	335,0	203,0	6,1	3,1	410,0	----	----	--	--	--	--	--	--
29.3.1969	3,66	255,0	216,0	256,0	9,6	11,2	290,0	8,5	17,8	7,1	53,0	3,4	10,4	8,0	25,2
31.3.1969	3,9	64,0	137,0	134,0	9,2	0,8	366,0	4,6	15,2	7,7	50,7	3,1	10,0	9,9	24,8
1.4.1969	4,2	42,0	77,0	151,0	4,8	3,3	300,0	3,15	14,4	7,2	52,5	3,5	10,0	9,5	24,5
21.4.1969	5,9	13,7	7,8	256,0	1,6	0,4	106,0	0,9	6,1	9,5	58,0	2,0	7,0	8,0	23,0

Akute Hepatitis, Rei. Max. 30 J., m.

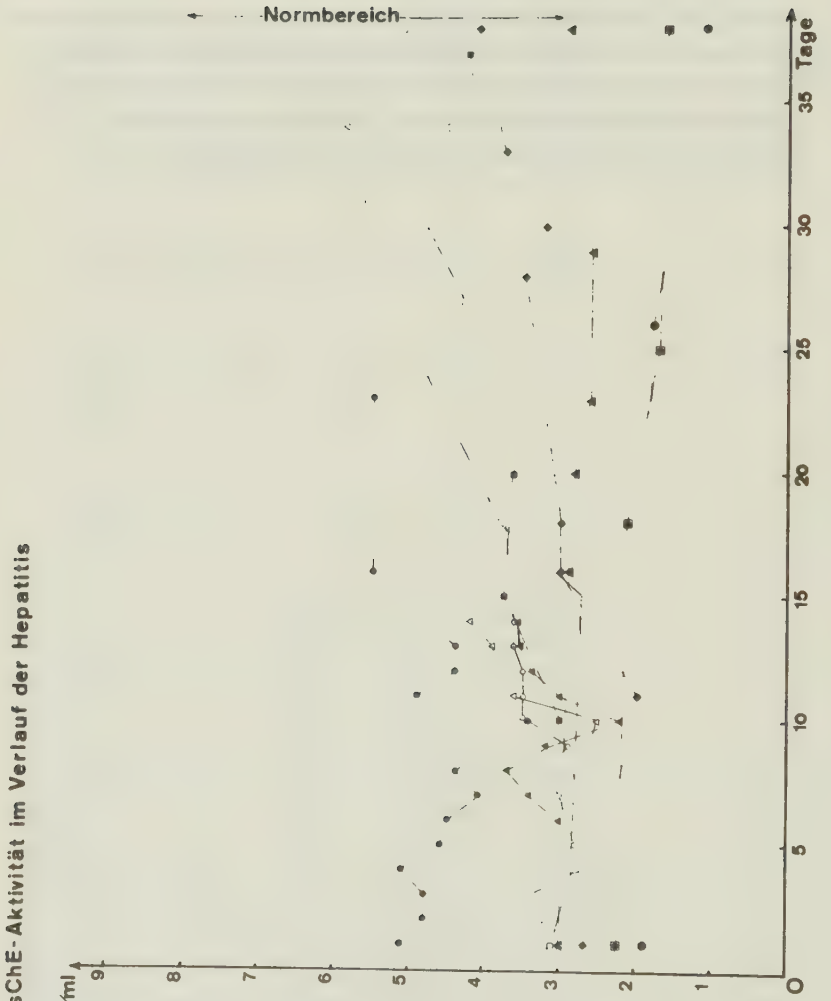
21.2.1969	3,13	77,2	37,4	169,0	4,4	1,2	120,0	10,0	2,8	--	--	--	--	--	--
24.2.1969	2,83	31,4	15,7	----	----	----	102,0	7,1	----	--	--	--	--	--	--
28.2.1969	2,8	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
7.3.1969	2,7	23,5	27,5	----	----	----	----	3,1	----	7,7	56,0	3,5	9,5	13,5	16,5
10.3.1969	3,8	19,6	19,6	----	----	----	----	2,4	----	--	--	--	--	--	--
17.3.1969	4,8	15,7	13,7	----	----	----	----	1,5	----	--	--	--	--	--	--
20.3.1969	4,7	7,8	11,7	----	----	----	----	1,3	----	--	--	--	--	--	--
23.3.1969	4,3	11,7	15,6	----	----	----	----	1,0	----	--	--	--	--	--	--
27.3.1969	4,7	11,7	19,6	----	----	----	----	1,0	----	--	--	--	--	--	--
2.4.1969	4,5	15,7	23,5	----	----	----	----	0,8	----	--	--	--	--	--	--
8.4.1969	5,1	11,7	19,6	92,0	----	----	33,0	0,6	----	--	--	--	--	--	--

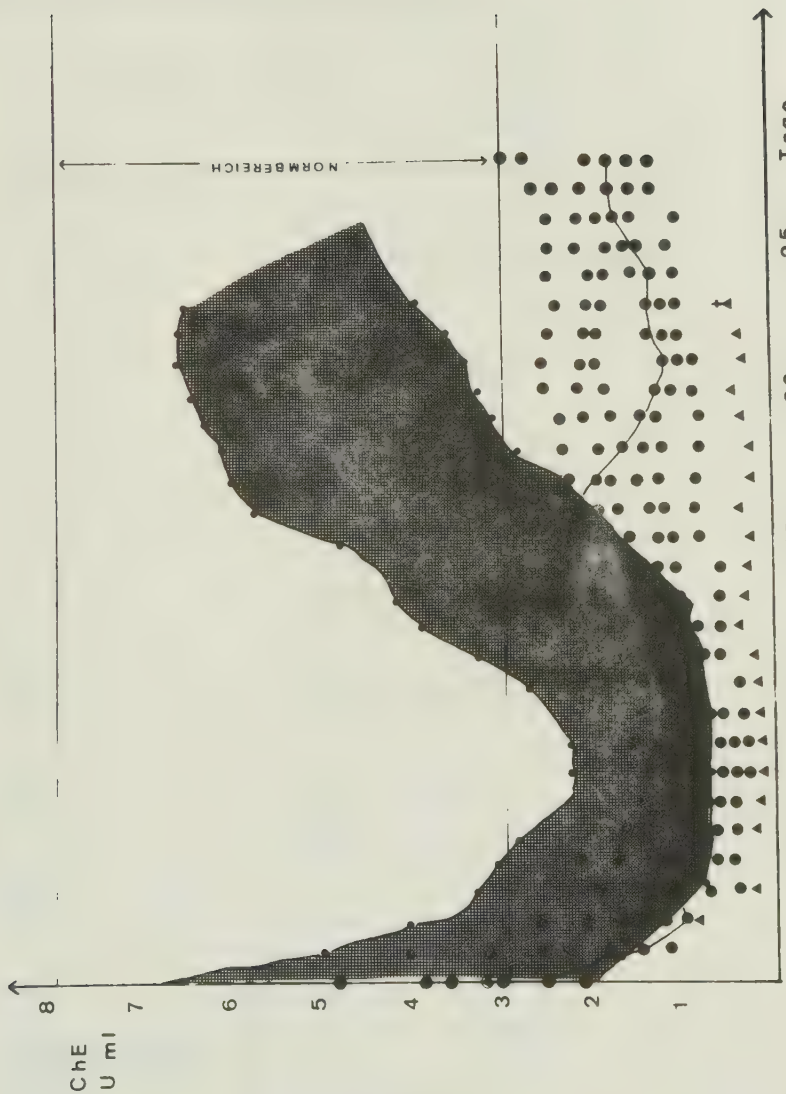
Chronische Hepatitis mit Übergang in Cirrhose histologisch gesichert, Kai. Emil., w.:

	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	GlDH mE/ml	SDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1- %	α_2- %	ß- %	γ-Glob. %
16.1.1969	3,0	----	----	----	----	----	----	----	----	--	40,5	2,0	5,0	6,5	42,5
30.1.1969	2,9	----	----	----	11,0	0,5	----	0,6	14,8	9,3	44,0	2,0	3,5	6,5	42,0
4.2.1969	2,83	----	----	----	9,0	3,5	----	----	----	--	--	--	--	--	--
7.2.1969	2,6	117,0	72,3	186,0	3,2	1,0	53,0	----	----	--	39,0	2,5	4,5	8,5	43,0
14.2.1969	2,6	137,0	71,0	186,0	----	----	----	0,6	----	--	--	--	--	--	--
27.2.1969	2,96	124,0	82,0	----	----	----	----	----	----	9,5	38,0	2,5	5,0	7,0	45,0
Chronische Hepatitis mit Übergang in Cirrhose histologisch gesichert, Jac. Eli, w.:															
14.1.1969	1,9	55,7	31,4	134,0	7,8	1,0	14,0	7,9	18,3	8,3	47,0	3,5	6,0	8,5	33,5
19.2.1969	1,8	47,5	51,6	186,0	6,5	0,5	38,0	----	----	--	--	--	--	--	--
27.2.1969	1,1	39,4	25,5	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
Chronische Hepatitis mit Übergang in Cirrhose histologisch gesichert, Sta. Ann. 68 J. w.:															
6.2.1969	2,25	174,0	137,0	246,0	0	5,4	81,0	2,8	12,5	8,4	41,5	2,5	6,5	10,5	38,5
24.2.1969	2,1	104,0	83,7	100,0	1,3	0,7	31,0	0,5	11,2	7,8	46,0	3,0	6,0	9,0	34,0
4.3.1969	1,7	27,4	29,4	----	----	----	60,0	----	----	--	--	--	--	--	--
11.3.1969	2,8	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
18.3.1969	1,6	115,7	7,9	117,0	----	----	41,0	----	----	--	--	--	--	--	--
6.4.1969	----	----	----	----	----	----	----	----	----	--	48,0	2,2	7,0	11,4	28,4

Graphische Darstellung der Ergebnisse:

Jeder Patient wird einzeln dargestellt.
Der Tag bei Einweisung ins Krankenhaus wird nicht als erster Krankheitstag gewertet. Die Einzelkurven werden so geordnet, daß die Gesamtheit ein gemeinsames Minimum an PsChE-Aktivität aufweist, was wohl dem tatsächlichen Verlauf der Heptatitis entspricht.
Hierzu siehe anschließend eine graphische Darstellung aus 151).


PsChE-Aktivität im Verlauf der Hepatitis
U/ml
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
5
10
15
20
25
30
35 Tage
Normbereich


ChE
U ml
8
7
6
5
4
3
2
1
NORMBEREICH
5
10
15
20
25
Tage

b) Akute Schockleber bei dekompensiertem Cor pulmonale.

Dieser Fall soll nicht anstelle der akuten oder subakuten gelben Leberdystrophie gezeigt werden.
Man könnte sich aber den Verlauf ähnlich vorstellen.

Klinischer Befund:

Zunehmender Ikterus und Oligurie bei handbreit vergrößerter Leber.

Klinisch-chemische Befunde:

(Tabelle umseitig)

Hl. Lor. 61 J. m.:

CAF - Elektrophorese

	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	GE g%	Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %	PZ %
0.2.1969	2,9	1960,0	643,0	4450,0	----	66,0	6,1	56,5	4,5	6,5	11,0	19,0	17,2
1.2.1969	2,25	3350,0	728,0	6670,0	670,0	62,0	--	--	--	--	--	--	22,0
2.2.1969	✝												

Autopsie:

Acinocentrale Massennekrosen der Leber ohne Reaktion
akute Schockleber.

Chronische Hepatitis (leichte bis schwere)

Name, Vorname Geschlecht, Alter				hist. ges.	klin. ges.	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %
1. Pla.	Ger.	w.	46 J.	ø	+	8,0	21,6	11,7	142,7	2,0	0,8	50,0	0,77	15,1	7,4	54,0	4,0	6,5	10,0	20,5
2. May.	Alo.	m.	70 J.	+	+	4,3	17,6	13,7	203,0	1,5	ø	80,0	1,63	14,7	7,0	61,0	3,0	6,0	10,0	16,0
3. Hoc.	Kar.	m.	52 J.	+	+	3,6	13,7	7,8	203,0	2,9	1,0	48,0	0,92	1,3	7,4	54,0	2,0	7,0	9,5	24,5
4. Hon.	Han.	m.	41 J.	+	+	9,6	13,7	19,6	134,2	1,4	0,7	30,0	0,68	3,0	8,3	67,0	2,0	6,0	9,0	15,0
5. Fre.	Mar.	w.	57 J.	+	+	3,3	235,0	75,0	292,0	1,6	2,9	75,0	22,0	14,6	8,4	46,0	3,4	6,8	6,8	40,4
6. Hub.	Mar.	w.	57 J.	+	+	2,6	11,7	13,7	92,0	1,4	0,7	53,0	0,74	9,6	7,9	47,0	2,5	7,0	9,0	32,0
7. Stü.	Joh.	m.	65 J.	+	+	2,1	9,8	5,9	134,0	0,5	0,7	42,0	0,28	0,8	7,2	43,0	5,0	11,5	13,0	25,0
8. Mro.	Chr.	w.	46 J.	+	+	5,1	81,5	104,5	134,2	2,5	4,4	134,0	0,61	13,3	9,9	45,0	2,5	5,5	8,5	35,5
9. Kur.	Elf.	w.	37 J.	+	+	3,3	7,8	11,8	329,0	2,0	0,1	16,0	0,34	4,1	7,4	59,7	3,1	6,7	12,0	16,0

d) Lebercirrhose, kompensiert

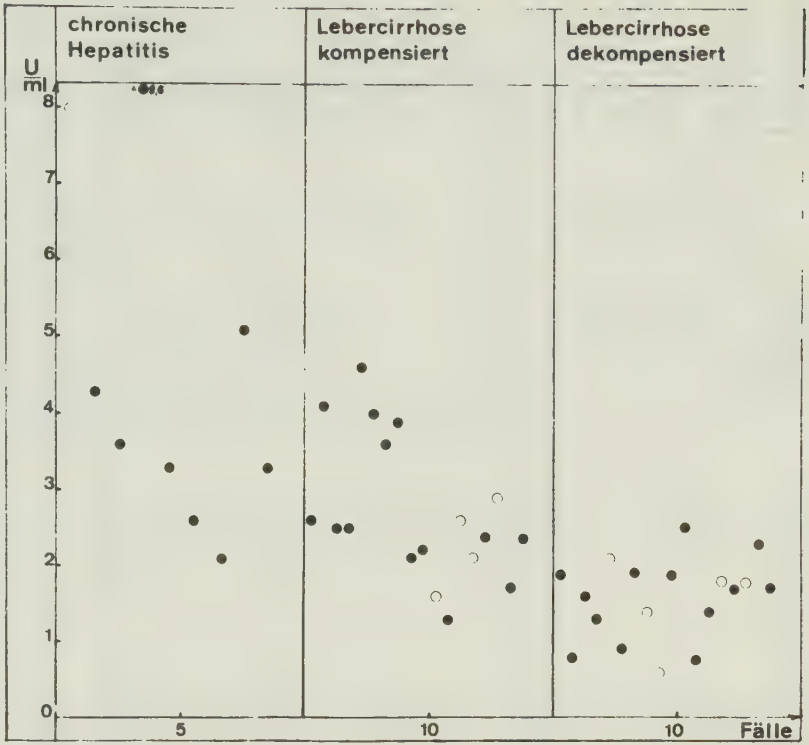
Name, Vorname Geschlecht, Alter	hist. ges.	klin. ges.	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg E	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %	Aetiologie
1. Kai. Emi. w. 66 J.	+	+	2,6	137,0	70,6	185,5	1,0	3,2	53,0	0,59	14,8	9,5	38,0	2,5	5,0	7,0	45,0	hep.
2. Ren. Mar. w. 63 J.	+	+	4,1	17,6	27,4	151,4	2,0	1,3	24,0	0,35	0,5	--	--	--	--	--	--	hep.
3. Kre. Hen. w. 64 J.	+	+	2,5	70,6	60,6	117,3	2,0	1,0	50,0	1,02	----	--	--	--	--	--	--	hep.
4. Kra. Kät. w. 62 J.	+	+	2,5	15,7	9,8	100,3	0,4	0,2	35,0	0,5	4,4	6,7	52,5	2,5	6,5	8,5	27,0	bil.?
5. Aua. Lor. m. 50 J.	+	+	4,6	9,8	11,7	134,2	0,5	1,0	36,0	0,61	2,1	6,25	62,5	2,0	6,0	10,0	17,0	hep.
6. Laz. Mic. m. 43 J.	+	+	4,0	435,0	374,0	292,0	6,4	7,8	42,0	3,21	15,5	8,0	55,5	2,5	5,0	6,5	28,5	hep.
7. Wer. Her. m. 49 J.	+	+	3,6	31,4	37,4	134,2	0,5	2,4	32,0	0,35	11,1	7,9	51,0	2,0	5,0	9,0	31,0	hep.
8. Dyk. Pet. m. 47 J.	+	+	3,9	25,5	17,6	117,3	0,7	2,7	176,0	0,76	9,4	8,4	46,0	4,0	7,0	10,0	30,0	hep.
9. Fer. Wil. m. 64 J.	+	+	2,1	33,5	7,8	151,4	0,5	0,6	82,0	1,71	4,0	7,5	38,0	3,0	9,2	12,0	38,0	Fett. hep.
10. Sed. Ann. w. 60 J.	+	+	2,2	39,4	31,4	134,2	1,2	0,8	175,0	5,37	3,9	6,2	48,2	5,6	9,2	11,0	25,0	hep.
11. Mit. Hei. m. 73 J.	-	+	1,6	19,6	9,8	151,4	1,0	3,0	37,0	0,67	5,5	8,82	47,8	4,0	11,8	9,2	24,0	Alk.
12. Wei. Ann. w. 72 J.	+	+	1,3	7,8	9,8	221,0	1,0	1,2	95,0	1,10	2,5	6,5	47,0	6,0	10,0	11,0	24,0	bil.hep.
13. Mah. Ott. m. 68 J.	-	+	2,6	11,7	5,9	159,7	0,4	1,9	58,0	1,34	1,3	8,05	57,0	4,0	10,5	8,0	18,0	Alk.
14. Hil. Jos. m. 47 J.	-	+	2,1	15,7	11,7	142,7	0,4	0,7	92,0	1,06	0,6	--	--	--	--	--	--	
15. Wei. The. w. 63 J.	+	+	2,7	11,7	7,8	108,9	0,6	1,7	77,0	0,72	4,1	7,55	44,0	3,5	7,5	10,5	30,5	hep.
16. Dam. Rud. m. 49 J.	-	+	2,9	49,5	19,6	117,3	3,1	15,0	119,0	2,60	2,86	7,7	47,2	4,6	10,2	12,0	22,0	hep.
17. Kön. Hil. w. 44 J.	+	+	1,7	35,5	15,7	134,2	0,4	1,0	172,0	2,0	6,73	8,6	37,0	3,0	6,0	10,0	41,0	hep.
18. Zot. Fra. m. 69 J.	+	+	2,7	7,8	15,7	117,3	1,0	1,9	54,0	0,51	3,9	8,0	54,5	2,5	5,5	8,0	25,0	hep.

) Lebercirrhose, dekompensiert, (Ascites, Coma) oder mit Komplikationen (z.B. Oesophagusvarizenblutung)

1. Jac. Eli w. 66 J.	+	+	1,9	55,7	31,4	134,2	1,0	7,8	224,0	7,91	18,3	8,3	47,0	3,5	6,0	8,5	33,5	hep.
2. Bic. Joh. m. 70 J.	+	+	0,8	15,7	13,7	203,0	1,3	1,4	82,0	0,92	4,3	4,1	38,5	4,5	11,5	10,5	30,0	Alk.
3. Sta. Ann. w. 69 J.	+	+	1,6	15,7	7,8	117,3	0,7	1,3	41,0	1,18	11,2	7,8	48,0	2,2	7,0	11,4	28,4	hep.
4. Sch. Alf. m. 60 J.	+	+	1,3	15,7	7,8	142,7	0,5	0,5	39,0	1,59	2,2	7,4	38,5	6,0	9,5	13,5	29,0	hep.
5. Rud. Mon. w. 63 J.	ø	+	2,1	23,5	15,7	221,0	1,6	1,2	81,0	1,53	7,0	6,4	43,5	3,5	9,5	10,0	31,0	Alk.
6. Led. Ger. w. 57 J.	+	+	0,9	45,5	19,6	274,0	0,1	0,8	55,0	1,36	8,1	7,2	28,5	3,5	3,5	17,0	46,0	hep.
7. Wen. Ott. m. 56 J.	+	+	1,9	9,8	17,6	100,3	0,5	0,6	48,0	1,30	5,7	7,9	48,0	4,0	7,0	10,0	27,0	bil. hep.
8. San. Cha. w. 72 J.	ø	+	1,4	13,7	5,9	292,0	1,6	1,1	96,0	1,24	1,4	4,9	38,0	9,0	13,0	10,0	29,0	Alk.
9. Grü. Jos. m. 63 J.	ø	+	0,6	13,7	7,8	194,5	----	0,6	38,0	1,30	2,1	6,0	46,5	6,0	6,0	10,0	31,0	Alk.
10. Ful. Cha. w. 42 J.	+	+	1,9	31,4	11,7	376,0	1,0	2,5	42,0	5,43	9,9	7,3	44,5	4,0	10,0	6,5	33,5	Alk.
11. Wol. Chr. m. 61 J.	+	+	2,5	11,7	7,8	203,0	1,5	0,3	57,0	3,19	6,8	7,5	51,0	2,0	4,0	9,0	33,0	
12. Ruc. Sof. w. 62 J.	+	+	0,8	15,7	7,8	134,2	0,4	0,6	54,0	1,07	7,3	6,6	41,0	4,0	8,8	10,4	34,8	hep.
13. Prü. Jos. m. 44 J.	+	+	1,4	15,7	7,8	92,0	1,0	0,5	76,0	0,70	3,4	6,9	42,5	3,0	6,0	6,5	40,5	hep.
14. Mig. Alf. m. 43 J.	ø	+	1,8	15,7	7,8	134,2	0,5	0,5	78,0	1,10	1,30	6,9	41,5	5,0	14,0	12,0	25,0	
15. Str. Ric. m. 63 J.	+	+	1,7	31,4	15,7	134,2	9,8	3,9	46,0	30,33	11,9	--	--	--	--	--	--	
16. Ste. Kun. w. 46 J.	ø	+	1,8	64,3	75,0	83,5	1,0	3,4	60,0	2,6	2,6	7,0	48,0	4,0	9,0	12,0	23,0	hep.
17. Böc. Wil. m. 48 J.	+	+	2,3	11,7	7,8	92,0	0,5	1,0	46,0	0,5	0,8	7,3	49,5	2,0	9,0	12,0	25,0	hep.
18. Rie. Mar. w. 58 J.	+	+	1,7	35,5	19,6	194,5	1,0	1,9	83,0	1,33	8,0	8,4	38,5	3,0	4,0	5,0	45,0	hep.

PsChE-Aktivität bei chronischen Lebererkrankungen

●histologisch klinisch gesichert



f) Lebercirrhose (posthep.) + Proteinurie

Name, Vorname Geschlecht, Alter	hist. ges.	klin. ges.	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %
1. Jpa. Eri. m. 57 J.	+	+	5,7	119,0	109,1	203,0	3,6	7,8	35,0	1,14	3,0	7,5	49,5	3,0	10,5	11,5	23,0
g) Cirrhose nach Amöbenhepatitis																	
1. Mol. Pet. m. 9 J.	+	+	2,6	68,4	35,5	151,0	1,0	4,1	360,0	1,4	3,3	7,1	46,0	3,5	6,0	10,5	29,5
h) Fettleber ohne Entzündung (hochgradig)																	
1. Wal. Mar. w. 37 J.	+	+	1,7	7,8	5,9	117,3	----	1,1	22,0	0,36	1,7	6,14	49,8	4,4	8,8	12,0	23,0
i) Cholelithiasis																	
1. Zam. Ann. w. 67 J.	+	Op.	4,7	104,5	66,4	142,7	2,8	7,6	400,0	1,89	0,6	6,35	62,2	4,0	8,8	8,6	12,4
2. Blü. Mar. w. 70 J.	+	+	2,3	11,7	11,7	83,5	----	----	97,0	----	----	----	--	--	--	--	--

k) Karzinome

Name, Vorname Geschlecht, Alter	Art des Karzinoms	Meta-stasen	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %
1. Gra. Geo. m. 72 J.	? Leber	?	2,5	51,6	19,6	256,0	1,6	∅	84,0	----	----	--	--	--	--	--	--
2. Zeh. Ann. w. 44 J.	Gallenblase	+	2,2	39,4	104,5	329,0	----	----	670,0	23,7	----	--	--	--	--	--	--
3. Ang. Lud. m. 57 J.	Reticulose	+	2,7	25,5	11,7	238,0	0,3	1,7	45,0	1,63	4,1	6,9	47,0	5,0	13,0	7,5	25,5
4. Fen. Max m. 58 J.	Magen	∅	2,7	11,7	3,9	92,0	0,6	1,6	34,0	0,51	0,8	6,7	61,0	2,5	7,5	10,5	15,5
5. Kar. Kat. w. 71 J.	Rectum	+	2,7	7,8	5,9	310,0	1,2	2,8	64,0	0,35	5,8	8,6	47,5	4,0	8,0	9,0	30,0
6. Eis. Max m. 71 J.	Magen	∅	2,6	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--
7. Bra. Fri. m. 70 J.	Bronch.	+	1,2	7,8	5,9	134,0	----	----	25,0	3,19	----	--	--	--	--	--	--
8. Hau. Wil. m. 68 J.	Bronch.	+	1,7	----	----	----	----	----	----	----	----	--	--	--	--	--	--

l) Rechtsherzinsuffizienz, dekompensiert

Name, Vorname, Geschlecht, Alter	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml	Bili mg %	Thym. MLE	GE g%	CAF - Elektrophorese Alb. %	α_1 %	α_2 %	ß- %	γ-Glob. %	Art der Erkrankung
1. Neu Xav. m. 61 J.	3,3	13,7	11,7	168,0	1,4	1,5	83,0	0,45	8,6	8,0	44,0	3,5	8,8	8,5	35,5	Cor pull., Diab. mell.
2. Koh. Fel. m. 80 J.	0,4	7,8	5,9	203,0	0,5	1,3	54,0	1,13	5,8	7,4	44,0	2,3	5,9	10,3	36,5	Cor bov., sek. Mitr.-V.
3. Gol. Mar. w. 69 J.	1,5	11,7	11,7	256,0	0,1	0,8	51,0	2,66	7,8	5,74	51,0	2,0	5,0	10,0	32,0	Mitralvitium
4. Fei. Ann. w. 65 J.	2,7	19,6	75,4	385,0	0,8	0,1	24,0	1,59	3,1	6,24	55,5	3,5	8,5	10,5	21,0	Cor pul., Emphysem
5. Bre. Mag. w. 81 J.	2,6	9,8	5,9	168,7	----	0,5	44,0	1,42	1,4	7,7	51,5	3,0	7,0	11,0	26,0	A-V-Block
6. Kri. Ant. m. 74 J.	2,7	11,7	7,8	221,0	----	----	----	1,59	----	--	--	--	--	--	--	Cor pul., Emphysembron.
" " 14 Tage nach Therapie	5,7	5,9	5,9	168,0	1,0	2,0	127,0	1,12	2,3	7,8	52,5	4,5	9,0	9,5	22,5	

m) Vergiftungsfälle:

Es werden vier Fälle von Vergiftungen mit Parathion (E 605) auf SChE-Aktivität untersucht.

1. Fri. Wil. w. 47 J.

4.11.1968	11^{45}	PsChE	=	0,15 U/ml
		EChE	=	unter 2% der Norm

nach Gabe von Toxogonin und Atropin

	17^{45}	ChE	=	0,50 U/ml
5.11.1968	8^{00}	ChE	=	0,80 U/ml
7.11.1968	8^{00}	ChE	=	1,80 U/ml

Bei dieser Vergiftung wurde die Therapie mit Toxogonin vor der irreversiblen Bindung des Parathions an die ChE eingeleitet. Die Patientin wurde als gesund entlassen. Wahrscheinlich war die Giftmenge, die eingenommen wurde, auch nicht sehr groß.

2. Spe. Ann. w. 44 J.

3.3.1969	12^{30}	ChE	=	1,45 U/ml
3.3.1969	16^{45}	ChE	=	1,15 U/ml
4.3.1969	9^{00}	ChE	=	1,11 U/ml
4.3.1969	14^{00}	ChE	=	1,19 U/ml
7.3.1969	7^{20}	ChE	=	1,28 U/ml

Diese Patientin kam nie in ein schweres Vergiftungsstadium.

3. Reh. Eng. m. 35 J.

14.2.1969	9^{00}	ChE	=	2,72 U/ml

Dieser Patient war ebenfalls nicht lebensbedrohlich vergiftet.

4. Sch. Max. w. 59 J.

24.2.1969 1 Stunde nach Giftaufnahme: Klinischer Tod! Reanimation möglich aber völlige Reflexlosigkeit.

	13^{30}	PsChE	:	keine Aktivität
		EChE	:	keine Aktivität
	Gabe von Toxogonin und Atropin			
	16^{00}	PsChE	:	0,12 U/ml
25.2.1969	Weitere Gaben von Atropin : Reflexlosigkeit			
	8^{00}	PsChE	:	0,13 U/ml
	16^{00}	PsChE	:	0,098 U/ml
26.2.1969	Reflexe schwach vorhanden			
	8^{00}	PsChE	:	0,074 U/ml
27.2.1969	8^{00}	PsChE	:	0,043 U/ml
28.2.1969	8^{00}	PsChE	:	0,055 U/ml
3.3.1969	Verschlechterung des Zustandes			
	8^{00}	PsChE	:	0,1 U/ml
	13^{40}	Exitus		

15. PsChE-Varianten in der Klinik

Beschreibung von zwei Fällen, bei denen nach Gabe von SuCh bei chirurgischen Eingriffen eine verlängerte Apnoe auftrat.

a) Eine "dibucainresistente" Variante der PsChE

Ein Patient hatte bei der chirurgischen Entfernung einer Cystocele 550 mg SuCh bekommen. Nach Beendigung des Eingriffs hatte der Patient eine Apnoe mit teilweiser Bewußtseinstrübung von 5 Stunden.

Die PsChE, mit der unter 13. beschriebenen Methode bestimmt, war um 12 h gleich 0,66 U/ml, also stark erniedrigt. Nach Gabe von Frischplasma erholte sich der Patient in der Nacht.

Klinisch-chemische Befunde, Hal. Ber. m., 53 J.

Datum		25.10.68	28.10.68	17.12.68	17.1.69
ChE	(U/ml)	0,66	1,0	1,0	1,0
SGOT	(mE/ml)	7,8	11,7		
SGPT	(mE/ml)	6,9	11,7		
LDH	(mE/ml)	134,0			

Datum		25.10.68	28.10.68	17.12.68	17.1.69
SDH	(mE/ml				
GlDH	(mE/ml)	0,8			
LAP	(mE/ml)	8,6			

Tochter und Gattin des Patienten hatten bei zweimaliger Untersuchung normale PsChE-Aktivitäten.
Die Mutter des Patienten lebt noch, konnte aber nicht zur Untersuchung herangezogen werden, so daß eine genetische Forschung in der Familie nicht einwandfrei durchgeführt werden konnte.
Vom Patienten wurde freundlicherweise eine größere Menge Serum zur Verfügung gestellt. Dieses hatte eine PsChE-Aktivität von 1,4 U/ml. Dabei wurde das Serum auf seine Dibucainzahl mit Hilfe der Methode nach Kalow, modifiziert nach Richterich, untersucht.

Ergebnisse:

		Hal. Ber.	Kontrollserum
Kalow	PsChE-Aktiv.	329 IU	801 IU
	DN	29	82

Somit steht fest, daß dieser Patient eine atypische Cholinesterase, ein "dibucain- und succinylcholinresistentes" Enzym besitzt und zwar homozygot.

b) Vermutlich eine "silent gen" - Pseudocholinesterase - Variante.

Eine in Malaya geborene Patientin wurde am 7.12.1968 durch Sectio caesarea entbunden und bekam 420 mg SuCh, wonach eine 3 1/2-stündige Apnoe bei teilweise erhaltenem Bewußtsein eintrat. Unter ähnlichen Umständen verlief die erste Sectio 1966.
Die klinisch-chemische Untersuchung des Serums der Patientin hatte folgende Ergebnisse:

Man. Yim. w. 30 J.

	ChE U/ml	SGOT mE/ml	SGPT mE/ml	LDH mE/ml	SDH mE/ml	GlDH mE/ml	APh mE/ml
7.12.68	0,54	17,6	11,7	160	1,4	1,0	45
16.12.68	0,42	11,7	9,8	186	0,9	2,5	50

Mit der Methode nach Kalow, modifiziert nach Richterich, war die Aktivität ohne Hemmung unter 50 IU, mit Hemmung praktisch Null.

Somit vermuten wir, daß die Patientin eine "silent gen"-PsChE-Variante besitzt, da mit der Methode nach Kalow praktisch keine Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Solche niedrigen Aktivitäten kommen selbst bei ausgeprägten Lebercirrhosen kaum vor. Wenn die Patientin keine solche Leberschädigung hat, was bei den obigen klinisch-chemischen Werten unwahrscheinlich ist, kann sich dieser seltene Fall hier eingefunden haben. Eine weitere Prüfung der Verhältnisse ist nicht möglich, da die Patientin eine Punktion der Leber ablehnte und ihre Familie nicht erreichbar ist.

Das Kind Man. m., am 7.12.1968 geboren, hatte am 16.12.1968 eine PsChE-Aktivität von 1,9 U/ml, was für Neugeborene ein fast normaler Wert sein kann. Somit kann auch angenommen werden, daß der Vater eine normale PsChE-Aktivität im Serum aufweist.

16. Untersuchungen, anhand eines Serums mit der "dibucainresistenten" PsChE-Variante, eine einfache photometrische Bestimmungsmethode für das Atypische Enzym zu erarbeiten.

In 15a) wurde ein Fall von "dibucainresistenter" PsChE-Variante vorgestellt. Anhand dieses Serums wird der Einfluß von verschiedenen Dibucain-Konzentrationen auf die Aktivität der PsChE-Variante im Vergleich zu zwei Seren mit normaler Dibucainzahl (DN) untersucht. Danach werden Seren mit der atypischen PsChE 1 : 1 mit diesen beiden Seren gemischt und als heterozygoter Typ konstituiert. Alle Bestimmungen erfolgen dreifach.

a) Zwei Seren mit normaler Dibucainzahl im Vergleich zur atypischen PsChE, bestimmt nach der Methode von Richterich (228), modifiziert nach Kalow und Genest (141).

Serum 2	801 IU	DN = 82
Serum 100	435 IU	DN = 79
Hal. Ber.	329 IU	DN = 29

b) Beziehung zwischen Dibucain-Konzentration und PsChE-Aktivität.

o Methode und Reagentien siehe 13 b)

o Arbeitsweise:

A) Substratlösung: 0,12 M BuThCh-Lösung

1,52 g S-BuThCh-Jodid werden auf 25 ml mit Aqua bidest. gelöst.

B) Puffer - DThbNBS-Lösung: 0,02 M

Phosphatpuffer, pH = 7,7, DThbNBS 0,00027 M, 13,8 g NaH_2PO_4 werden zusammen mit 500 mg DThbNBS auf ca. 4 000 ml Aqua bidest. gelöst. Diese Lösung wird mit 1 n NaOH auf pH = 7,7 eingestellt und anschließend auf genau 5 000 ml aufgefüllt.

C) Dibucain-Lösung: 10^{-3}M

38 mg Dibucain werden mit Lösung B auf 100 ml gelöst. Daraus werden mit Lösung B verschiedene Konzentrationen hergestellt.

C_1 = 10^{-3}M Dibucain
C_2 = 5×10^{-4}M Dibucain
C_3 = 10^{-4}M Dibucain
C_4 = 5×10^{-5}M Dibucain
C_5 = 10^{-5}M Dibucain
C_6 = 5×10^{-6}M Dibucain
C_7 = 10^{-6}M Dibucain

o Ansätze:

	Normal	Hemmung
Lösung B	2,0 ml	-----
Lösung C_1 - C_6	-----	2,0 ml
Lösung A	0,1 ml	0,1 ml
Serum	0,01 ml	0,01 ml

mischen und bei λ = 405 nm und 25°C Extinktionsänderung 0,1 in Sekunden abstoppen.

o Berechnung:

$$U/ml = \frac{95,2}{t}$$

o Ergebnisse:

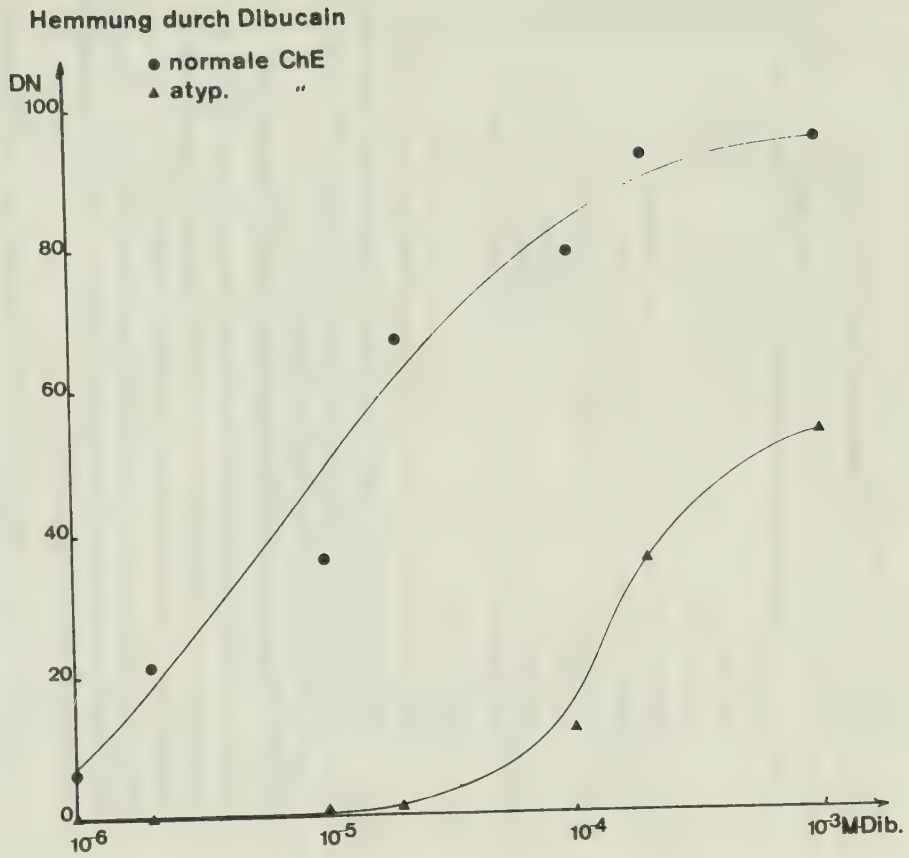
in PsChE-Aktivität:

Dibucainkonzentration	Hal. Ber.	Serum 2	Serum 100
----------	1,44 U/ml	5,3 U/ml	3,0 U/ml
10^{-3}M	0,67 U/ml	0,2 U/ml	0,17 U/ml
5×10^{-4}M	0,92 U/ml	0,4 U/ml	0,22 U/ml
10^{-4}M	1,27 U/ml	1,0 U/ml	0,65 U/ml
5×10^{-5}M	1,42 U/ml	1,7 U/ml	1,00 U/ml
10^{-5}M	1,42 U/ml	3,4 U/ml	1,90 U/ml
5×10^{-6}M	1,44 U/ml	4,1 U/ml	2,40 U/ml
10^{-6}M	1,44 U/ml	5,0 U/ml	2,80 U/ml

Hemmung in Prozent:

Dibucainkonzentration	Hal.Ber.	Serum 2	Serum 100
----------	0 %	0 %	0 %
10^{-3}M	53 %	91,2 %	94,4 %
5×10^{-4}M	36 %	92,5 %	92,7 %
10^{-4}M	12 %	81,0 %	78,0 %
5×10^{-5}M	1 %	68,0 %	67,0 %
10^{-5}M	0 %	36,0 %	37,0 %
10^{-6}M	0 %	6,0 %	7,0 %

Graphische Darstellung:


Hemmung durch Dibucain
● normale ChE
▲ atyp. "
DN
100
80
60
40
20
0
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}MDib.

Die Kurven nähern sich bei Konzentration Dibucain gegen Null der Grundlinie, bei Dibucain in steigender Konzentration der 100%-Hemmlinie.

c) Mischen von Normalseren mit dem Serum, das die atypische PsChE enthält,

im Verhältnis 1 : 1 bei Dibucainkonzentration 10^{-4}M.

	PsChE-Aktivität	DN
Serum 60	3,9 U/ml	82
Hal. Ber.	1,33 U/ml	22
Mischserum ($\frac{60}{\text{Hal}} = \frac{1}{1}$)	2,57 U/ml	66
Serum 20	5,6 U/ml	82
Hal. Ber.	1,42 U/ml	19
Mischserum ($\frac{60}{\text{Hal}} = \frac{1}{1}$)	3,4 U/ml	69

Damit werden Normalwerte konstruiert. Die atypische PsChE hat bei 10^{-4}M Dibucain eine DN von ca. 20, die normale PsChE von ca. 80 und der Heterozygote von unter 70.

17. Beziehungen zwischen Dibucainkonzentration und PsChE-Aktivität,

anhand eines Normalserums, eines Serums mit atypischer PsChE und eines Serums, das sowohl atypische PsChE als auch normale enthält, dessen Träger also heterozygote Merkmale aufweist.
Nach den Versuchen in 16. konnten wir das Serum Nr. 16 Sch. Ren. w, 27 J. aus der Ermittlung der Normalwerte in 11. ausklammern und für den folgenden Versuch gewinnen.

In 11. wurde für die Bestimmung der Normalwerte bei einer Dibucainkonzentration von 5×10^{-5} eine DN von 63 ermittelt, die aus der Reihe fiel. Auch die PsChE-Aktivität selbst war auffallend niedrig. Diese Person ist demnach heterozygot für die "dibucainresistente" PsChE-Variante. Im folgenden Versuch werden ein Normalserum, das Serum mit der atypischen PsChE und das Serum, das beide Typen enthält, verschiede-

nen Dibucainkonzentrationen ausgesetzt, um die optimale Dibucainkonzentration zu ermitteln, die für eine Trennung dieser drei Typen geeignet ist.

a) Versuchsbedingungen:

Die Bestimmung der PsChE-Aktivität weicht nur geringfügig von der unter 13 a) ab. Statt 2 ml Monotestgläser werden solche mit 4 ml verwendet. Die Bedingungen bleiben gleich, nur die hinzugegebene Serummenge von 0,02 ml ist genauer zu pipettieren, die Ergebnisse werden exakter.

o Herstellen einer Dibucainlösung 1×10^{-3}M:

Dibucainhydrochlorid wird mit absolutem Diäthyläther geschüttelt, im Faltenfilter filtriert, getrocknet und abgewogen.
38 mg dieses kristallinen Pulvers werden auf 100 ml Aqua bi. dest. gelöst.
Daraus werden mit Aqua bidest. folgende Verdünnungen hergestellt:

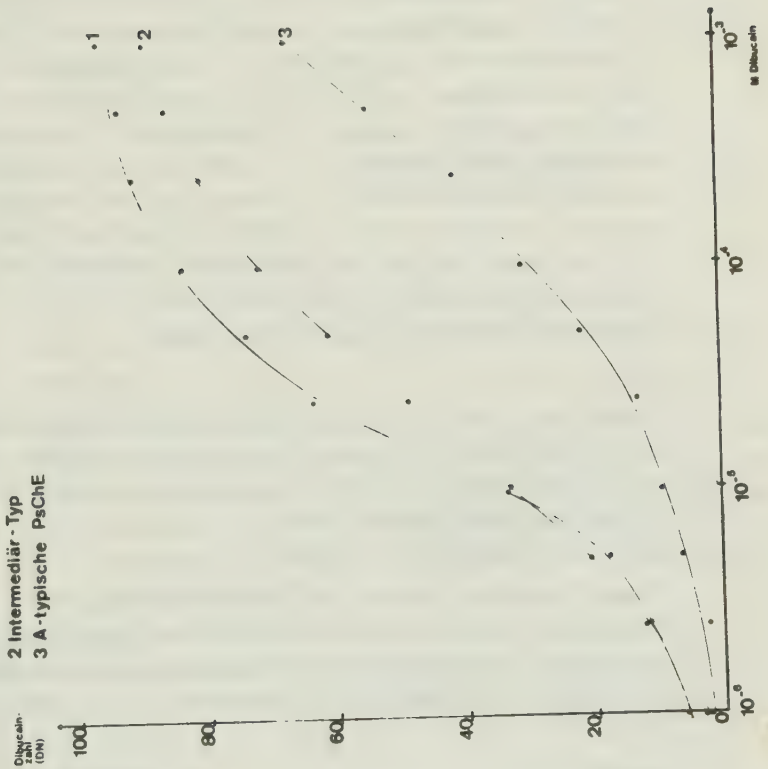
5×10^{-4}M; $2,5 \times 10^{-4}$M; 1×10^{-4}M; 5×10^{-5}M; $2,5 \times 10^{-5}$M; 1×10^{-5}M; 5×10^{-6}M; $2,5 \times 10^{-6}$M und 1×10^{-6}M.

Mit jeweils 4 ml dieser Lösung werden die Monoteströhrchen aufgefüllt und nach Zugabe der Seren die Zeit ermittelt, die zur Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,1$ nötig ist bei $\lambda = 405$ nm und $25^{\circ}C$. Es werden Doppelbestimmungen gemacht.

b) Ergebnisse:

Serum	Nr. 66		Sch. Ren.		Hal. Ber.	
4 ml	1	2	1	2	1	2
Aqua bidest.	14 sec	14 sec	29 sec	29 sec	65 sec	64 sec
1×10^{-6}M Dib.	15 sec	14,5sec	30 sec	30 sec	66 sec	66 sec
$2,5 \times 10^{-6}$M "	16 sec	16 sec	33 sec	33 sec	66 sec	66 sec
5×10^{-6}M "	17 sec	17 sec	36 sec	37 sec	70 sec	68 sec
1×10^{-5}M "	21 sec	21 sec	43 sec	44 sec	70 sec	72 sec
$2,5 \times 10^{-5}$M "	38 sec	39 sec	56 sec	57 sec	74 sec	74 sec
5×10^{-5}M "	54 sec	54 sec	75 sec	75 sec	82 sec	80 sec
1×10^{-4}M "	88 sec	86 sec	104 sec	104 sec	92 sec	94 sec
$2,5 \times 10^{-4}$M "	170 sec	175 sec	153 sec	150 sec	105 sec	115 sec
5×10^{-4}M "	220 sec	220 sec	205 sec	215 sec	145 sec	140 sec
1×10^{-3}M "	430 sec	430 sec	280 sec	270 sec	200 sec	195 sec

Graphische Darstellung:


HEMMUNG DER DREI PsChE-TYPEN
1 Normal-Typ
2 Intermediär-Typ
3 A-typische PsChE
Dibucain-Zahl (DH)
100
80
60
40
20
0
10⁻⁵
10⁻⁴
10⁻³
M Dibucain
1
2
3

Werden die Prozent der Hemmung dieser drei Seren gegen den fallenden negativen Logarithmus der Konzentration von Dibucain aufgetragen, so ergeben sich drei unterschiedliche Kurven: Sie haben gemeinsam, daß sie bei der Dibucainkonzentration gegen Null die volle Aktivität erreichen und bei steigendender Dibucainkonzentration gegen die 100%ige Hemmung hin streben. Dazwischen verhalten sie sich verschieden. Die atypische PsChE und auch deutlich der intermediäre Typ werden zwischen Dibucain = 10^{-6}M und 10^{-3}M weniger stark gegenüber dem Normaltyp gehemmt. An den Punkt der Abszisse - log [Dibucain] , wo die drei Kurven am stärksten voneinander abweichen, sind die einzelnen Typen am besten voneinander zu unterscheiden, d.h. dort muß man die Dibucainkonzentration zur Bestimmung der Dibucainzahl (DN) wählen. Bei dieser Kurve ist das im Bereich zwischen 2,5 und 5 x 10^{-5}M Dibucain der Fall. Damit läßt sich die konfektioniert verfügbare Methode wie folgt zur Bestimmung der Dibucainzahl erweitern.

18. Die photometrische Bestimmung der Dibucainzahl.

o Prinzip: siehe 10.

Durch Zusatz von Dibucain zum Puffer - DThbNBS-Gemisch bei 13. wird die exakte Ermittlung der Dibucainzahl möglich, so können also die Patienten ermittelt werden, die nach SuCh-Gabe eine verlängerte Apnoe erleiden würden.

a) Monotest - Cholinesterase (siehe 13.)

Zusatz: Herstellen einer 5 x 10^{-5}M Dibucainlösung:
Dibucainhydrochlorid wird mit absolutem Diäthyläther entwässert, getrocknet. 19 mg dieser Kristalle werden in 1 000 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung ist im Kühlschrank ca. eine Woche haltbar.

o Ansätze:
In ein Testglas pipettieren:

	PsChE-Aktiv.	Hemmung
Aqua bidest.	2,0 ml	---------
Dibucain 5 x 10^{-5}M	---------	2,0 ml
Serum	0,01 ml	0,01 ml
	E = 0,1 abstoppen t	E = 0,02 abstoppen t_H

o Berechnung:

$$\text{PsChE-Aktivität} = \frac{90,7}{t} \quad \text{U/ml}$$

$$\text{DN} = 100 - \frac{20 \times t}{t_H}$$

b) Kinetischer Test ChE

Zusatz

o Lösungen:

Dibucainlösung 5 x 10^{-5}M

Dibucainhydrochlorid wird mit absolutem Diäthyläther entwässert, getrocknet, 19 mg Dibucain werden in 1 000 ml Aqua bidest. gelöst. Mit dieser Lösung wird ein zweites Fläschen, das mit Puffer-Lösung bezeichnet ist, auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist ca. eine Woche verwendbar, muß aber im Kühlschrank und in dunkler Flasche aufbewahrt werden.

o Ansätze:

	PsChE-Aktiv.	Hemmung
Pufferlösung	2,0 ml	--------
Dibucainlösung	--------	2,0 ml
Substratlösung	0,1 ml	0,1 ml
Serum	0,01 ml	0,01 ml
	Δ E = 0,1 abstoppen → t	Δ E = 0,02 abstoppen → t_H

o Berechnung:

$$\text{PsChE-Aktivität} = \frac{95,2}{t} \text{ U/ml}$$

$$DN = 100 - \frac{20 \times t}{t_H}$$

o Normalwerte:

Normal: PsChE-Aktivität = 3,0 - 8,0 U/ml
DN ca. 80

Intermediärtyp: PsChE-Aktivität etwa an der Normgrenze
$20 \ll DN < 70$

atypische PsChE: PsChE-Aktivität unter der Normgrenze
DN ca. 20

Damit lassen sich die Typen eindeutig abgrenzen bis zur Ermittlung der Normalwerte für diese Methode aus einer sehr großen Population.

19. Diskussion:

Aus dem Studium der Literatur zum Thema "PsChE-Aktivität" ergibt sich, daß die Bestimmung dieses Enzyms im Serum eine Bereicherung für die medizinische Laboratoriumsdiagnostik bedeuten kann: Die Verlaufskontrolle der akuten Hepatitis, die Diagnose der Lebercirrhose, die Kontrolle der Leberfunktion bei dekompensierter Rechtsherzinsuffizienz, die schnelle, lebenswichtige Bestätigung, daß es sich um eine Vergiftung mit ChE-Hemmstoffen handelt und die Orientierung vor der Narkose, ob ein Patient Succinylcholin verträgt, durch die Bestimmung der Dibucainzahl.

Es gibt kaum noch Zweifel, daß das Enzym aus der Leber stammt (s.B. III.). Eine grundlegende Arbeit hierüber wäre mit Hilfe der neuen Methode möglich. Ebenso wäre eine Klärung der physiologischen Funktion zu begrüßen.

Mit der Vorstellung einer einwandfreien Methode und ihrer klinischen Prüfung will diese Arbeit zur Überprüfung und Weiterentwicklung des Wissens über das Enzym PsChE anregen. Die Ergebnisse verschiedener Autoren waren bisher nicht vergleichbar, weil sehr unterschiedliche Methoden angewandt wurden (s.B. X.). Zu den besten möchten wir die von

Weber (269)[+)] und von Kalow (141) zählen. Weber zeigte eine gut reproduzierbare schnelle Bestimmungsmethode, verwendet jedoch wie viele andere Acetat als Substrat. Das muß abgelehnt werden, denn gerade die Acetate der Cholin- und Nichtcholinester werden von der AChE (= EChE) mit optimaler Geschwindigkeit hydrolysiert. Da leichte Hämolyse immer EChE freisetzt und da vermutet wird, daß es im Serum eine AChE gibt (71, 218, 219), kann die Bestimmung der PsChE im Serum mit AThCh als Substrat nicht immer fehlerfrei bleiben. BeCh und BuThCh sind selektive Substrate der PsChE, wie aus den Versuchen unter B XI. 2. und 3. hervorgeht.

Für das Routinelaboratorium ist die Methode von Kalow (141) nicht geeignet, weil die Anschaffung eines Spektralphotometers zu kostspielig wäre. Allein die photometrische Bestimmung mit BuThCh als Substrat und DThbNBS als SH-Gruppenindikator erfüllt die Forderung nach Substratspezifität und geringem Aufwand in gleicher Weise.

Über die Wahl des Puffers, der Wasserstoffionenkonzentration s.B. XI, 4. und 6. Der Extinktionskoeffizient für die Farbentwicklung aus DThbNBS mit frischem Glutathion betrug 13, x 10^6 Mol^{-1} cm^2 (B XI 5.).

Damit stand die Methode zur einfachen photometrischen Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum fest. Bevor wir nun eine ausreichend große Anzahl von Seren gesunder Probanden untersuchten, sollte noch diejenige Konzentration des kompetitiven ChE-Hemmstoffs Dibucain ermittelt werden, die ausreicht, normale PsChE unter den geschaffenen Bedingungen zum gleichen Prozentsatz zu hemmen, wie Kalow und Genest ihn bestimmten zur optimalen Trennung der drei Typen von PsChE (B XI 9.).

Die Möglichkeit, mit einer einfachen photometrischen Methode Succinylcholinempfindliche Patienten vor der Gabe des Muskelrelaxans zu entdecken, bedeutet einen Gewinn. Zwar wäre es möglich, auch andere Methoden so weiterzuentwickeln, z.B. die von Weber (269), doch gerade hierfür ist das Substrat AThCh ungeeignet. Menschen mit atypischer PsChE zeigten bisher keinerlei Veränderung der EChE. Die Hemmrate eines atypischen Enzyms kann so verdeckt werden durch freigesetzte EChE und im Serum vorhandene AChE, und das besonders leicht, weil diese Individuen eine PsChE-Aktivität aufweisen,

---

[+)] TCE Boehringer & Söhne

die weit unter dem 2 s-Bereich der Normalverteilung liegt.

Mit dieser rein empirisch gefundenen Hemmkonzentration des Dibucain fand sich unter den 50 untersuchten Probanden zur Aufstellung der Normalwerte ein Individuum, dessen PsChE-Aktivität unter der unteren Normgrenze und die Hemmrate durch 5 x 10^{-5}M Dibucain im Ansatz 10% unter der der anderen lag. Bei weiteren Untersuchungen stellte es sich heraus, daß hier ein Intermediärtyp nach Kalow vorlag. Die Normalwerte zeigten, daß die PsChE-Aktivität Gesunder eine große biologische Streuung aufweist. Diese Tatsache engt die breite Anwendung der Bestimmung ein.

Ändert man die Wasserstoffionenkonzentration bis zur Grenze des Möglichen - bei pH 8,0 zerfällt bereits der Indikator DThbNBS - bis pH 7,7 und vergleicht unterfast gleichen Bedingungen (6 x 10^{-3}M statt 5 x 10^{-3}M BuThCh im Ansatz), so liegen die Werte um ca. 13% höher, auch die Normalwerte. Die physiologische Streubreite wird noch weiter aufgefächert, weil der prozentuale Zuwachs höherer Aktivitäten relativ größer ist als der niedrigerer.
Die Arbeitsweise mit pH 7,7 bringt gegenüber der mit pH 7,2 kleine Vorteile. Die Überwachung des PsChE-Spiegels wird verfeinert, die Grenze zum pathologischen Bereich klarer. Dies und die einfache Verwendbarkeit einer konfektionierten Methode veranlaßte uns, diese auch zur klinischen Prüfung heranzuziehen, zumal ja allgemeingültige Aussagen gemacht werden sollen.
Über die klinische Prüfung der Methode,
zu 14 a):
Trotz der kleinen Zahl von Fällen akuter Hepatitis, die möglichst täglich kontrolliert wurden, zeichnet sich ein gemeinsamer Verlauf in der Änderung der PsChE-Aktivität ab.
Nach Ausbruch der Erkrankung sinkt die PsChE-Aktivität zunächst ab, meist unter die 2 s-Grenze der Normalverteilung, um dann unterschiedlich schnell wieder zur Norm anzusteigen. Diese Befunde decken sich mit denen anderer Autoren (24, 148, 151, 158, 166, 186, 216, 233). Bei unseren Fällen besteht ein Zusammenhang zwischen der PsChE-Aktivität, Bilirubin und Transaminase-Aktivität. Wenn Bilirubin und Transaminasen eine fallende Tendenz zeigen, steigt die PsChE-Aktivität. Bei drei Fällen von chronischer Hepatitis mit Umbau in Cirrhose sinken die Transaminasen und das Bilirubin, während die PsChE-Aktivität unter der 2 s-Grenze der Normalverteilung bleibt.

Nach Lang (166), Weidemann (270) und Knedel (151) ist bei bleibendem niedri-

gen PsChE-Spiegel im Serum ein Übergang der akuten in chronische Hepatitis anzunehmen. Die laufende Kontrolle der PsChE-Aktivität bei der akuten Hepatitis gibt Auskunft über den Stand der Leberfunktion. Sinkt die Aktivität weiterhin ab, so ist die Krankheit im Anfangsstadium. Kehren die Werte zur Norm zurück, so ist mit baldiger Genesung zu rechnen. Fallen sie erneut ab oder bleiben sie niedrig, so ist Übergang in chronische Hepatitis anzunehmen, obwohl Transaminasen und Bilirubin zur Norm zurückkehren.

Signifikanzteste,
zu 14 c, d, e und l:

Zum Nachweis der Signifikanz der ermittelten Werte wird ein einfacher Vergleich der Mittelwerte nach der "Student"-Verteilung vorgenommen. Beim Nachweis des signifikanten Unterschiedes erfolgt der Vergleich der Standardabweichungen der Stichprobe und der Grundgesamtheit nach der F-Verteilung.

Formeln:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu| \sqrt{N}}{s_n - 1} \qquad FG = n - 1$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \qquad s_1 > s_2 \qquad FG = n - 1$$

μ und σ der Grundgesamtheit der verwendeten Methoden:

(Tabelle umseitig)

	μ	σ		μ	σ
ChE	5,5	1,25	Thym.	1,5	0,75
SGOT	6,0	3,0	GE	6,5	0,5
SGPT	6,0	3,0	Alb.	63,7	1,93
LDH	?	?	α_1-Glob.	2,3	0,48
SDH	0,5	0,25	α_2-Glob.	5,9	0,87
GlDH	0,5	0,25	ß- Glob.	8,7	0,91
APh	37,0	11,0	γ-Glob.	15,3	1,40
Bili	0,5	0,3			

SGOT, SGPT, SDH und GlDH werden ebenfalls dem Signifikanztest der "Student"-Verteilung unterzogen, obwohl der theoretische Mittelwert der Grundgesamtheit vom tatsächlichen Gipfelpunkt der Verteilung dieser Enzyme minimal nach oben abweicht. Erwiesene Signifikanz ist auch für den Gipfelpunkt gültig.

Chronische Hepatitis:

	$\bar{x}$	s	N	$\hat{t}$po,05	$\hat{t}$p 0,1	t	$\hat{F}$po 0,5	$\hat{F}$p 0,1	F	pathol. in %
ChE	4,66	2,53	9	1,86	1,397	0,996	2,93	2,29	9,98	22 %
SGOT	45,8	74,5	9	1,86	1,397	1,602	2,93	2,29	617,0	78 %
SGPT	29,3	35,3	9	1,86	1,397	1,98	2,93	2,29	138,0	56 %
LDH	184,9	80,0	9	1,86	1,397	-----	2,93	2,29	-----	44 %
SDH	1,76	0,69	9	1,86	1,397	5,478	2,93	2,29	7,52	89 %
GlDH	1,41	1,46	9	1,86	1,397	1,87	2,93	2,29	34,24	25 %
APh	58,7	34,5	9	1,86	1,397	1,887	2,93	2,29	9,8	33 %
Bili	3,1	7,1	9	1,86	1,397	1,098	2,93	2,29	560,0	25 %
Thym.	8,5	6,17	9	1,86	1,397	2,958	2,93	2,29	67,5	33 %
GE	7,88	0,88	9	1,86	1,397	1,295	2,93	2,29	3,07	11 %
Alb.	53,0	8,1	9	1,86	1,397	3,962	2,93	2,29	17,6	78 %
α_1-Glob.	3,05	1,0	9	1,86	1,397	2,25	2,93	2,29	4,29	22 %
α_2-Glob.	7,0	1,76	9	1,86	1,397	1,875	2,93	2,29	4,11	11 %
ß -Glob.	9,76	1,82	9	1,86	1,397	1,747	2,93	2,29	3,98	11 %
γ-Glob.	25,0	9,2	9	1,86	1,397	3,163	2,93	2,29	43,0	67 %

Diese Auswahl klinisch-chemischer Befunde zeigt bei SDH, den Albuminen und Gamma-Globulinen eindeutig signifikant pathologische Werte. Weniger signifikant sind die Werte für SGOT, SGPT, GlDH, APh und Thymoltrübung, weil die Zahl der Untersuchten relativ klein ist. Nicht signifikant pathologisch sind die Werte für ChE, Bilirubin und Gesamteiweiß.

Lebercirrhose, kompensiert:

	$\bar{x}$	s	N	$\hat{t}_{po,\ 05}$	$\hat{t}_{p\ 0,1}$	t	$\hat{F}_{po,\ 05}$	$\hat{F}_{p\ 0,1}$	F	pathol. in %
ChE	2,76	0,93	18	1,740	1,333	12,5	1,96	1,69	1,806	72 %
SGOT	54,2	100,0	18	1,740	1,333	2,045	1,96	1,69	1111,0	67 %
SGPT	41,35	85,0	18	1,740	1,333	1,764	1,96	1,69	802,0	56 %
LDH	148,9	45,9	18	1,740	1,333	-----	1,96	1,69	-----	11 %
SDH	1,28	1,48	18	1,740	1,333	2,953	1,96	1,69	35,0	28 %
GlDH	2,63	3,53	18	1,740	1,333	2,86	1,96	1,69	199,0	56 %
APh	78,3	50,9	18	1,740	1,333	3,44	1,96	1,69	21,4	44 %
Bili	1,36	1,3	18	1,740	1,333	2,81	1,96	1,69	18,8	39 %
Thym.	5,5	4,58	17	1,746	1,337	3,705	2,01	1,72	37,3	64 %
GE	7,71	0,98	15	1,761	1,345	0,83	2,13	1,8	3,84	⟨13 %⟩ 20%
Alb.	48,4	7,76	15	1,761	1,345	7,943	2,13	1,8	16,2	93 %
α_1-Glob.	3,45	1,23	15	1,761	1,345	3,62	2,13	1,8	6,57	47 %
α_2-Glob.	7,6	2,35	15	1,761	1,345	2,8	2,13	1,8	7,3	40 %
ß -Glob.	9,5	1,77	15	1,761	1,345	1,75	2,13	1,8	3,78	27 %
γ-Glob.	28,4	7,94	15	1,761	1,345	6,39	2,13	1,8	32,0	80 %

Die Diagnose der beginnenden Cirrhose ist zu stellen aus den hochsignifikant pathologischen Werten der PsChE, Albumin- und Gamma-Globulinverteilung in Verbindung mit den signifkant pathologischen Werten der SGOT, SGPT, GlDH, APh, Thymoltrübung und des Bilirubins.

Lebercirrhose, dekompensiert:

	$\bar{x}$	s	N	$\hat{t}_{po,05}$	$\hat{t}_{p\,0,1}$	t	$\hat{F}_{po,05}$	$\hat{F}_{p\,0,1}$	F	pathol. in %
ChE	1,58	0,34	18	1,74	1,333	48,9	1,96	1,69	13,5	100 %
SGOT	24,6	16,1	18	1,74	1,333	4,9	1,96	1,69	28,8	78 %
SGPT	16,0	16,1	18	1,74	1,333	2,635	1,96	1,69	28,8	44 %
LDH	173,5	20,2	18	1,74	1,333	-----	1,96	1,69	----	33 %
SDH	1,4	2,2	18	1,74	1,333	1,736	1,96	1,69	77,4	28 %
GlDH	1,66	1,84	18	1,74	1,333	2,675	1,96	1,69	54,17	50 %
APh	69,2	42,7	18	1,74	1,333	3,199	1,96	1,69	15,1	39 %
Bili	3,59	6,7	18	1,74	1,333	1,957	1,96	1,69	499,0	72 %
Thymol	6,24	4,6	18	1,74	1,333	4,372	1,96	1,69	37,6	67 %
GE	6,9	1,42	17	1,746	1,337	1,742	2,01	1,72	8,06	<18 %
Alb.	43,1	5,8	17	1,746	1,337	14,6	2,01	1,72	9,03	100 %
α_1-Glob.	4,1	1,66	17	1,746	1,337	4,47	2,01	1,72	11,96	71 %
α_2-Glob.	8,1	3,08	17	1,746	1,337	2,945	2,01	1,72	12,5	53 %
ß -Glob.	10,3	2,63	17	1,746	1,337	2,5	2,01	1,72	8,35	35 %
γ-Glob.	32,0	6,82	17	1,746	1,337	10,1	1,72	1,72	23,73	100 %

Signifikant pathologisch sind außer SDH und Gesamteiweiß alle hier gewählten klinisch-chemischen Werte. Höchstens diagnostischen Wert haben die Bestimmung der PsChE, SGOT, GlDH, des Bilirubins, der Thymoltrübung und die Elektrophorese.

Rechtsherzinsuffizienz, dekompensiert

	$\bar{x}$	s	N	$\hat{t}_{po,05}$	$\hat{t}_{p\,0,1}$	t	$\hat{F}_{po,05}$	$\hat{F}_{p\,0,1}$	F	pathol. in %
ChE	2,2	0,91	6	2,015	1,476	8,88	4,36	3,1	1,887	83 %
SGOT	12,4	4,0	6	2,015	1,476	3,92	4,36	3,1	1,778	33 %
SGPT	19,7	27,43	6	2,015	1,476	1,2	4,36	3,1	83,6	17 %
LDH	233,0	83,38	6	2,015	1,476	----	4,36	3,1	----	67 %
SDH	0,7	0,5477	4	2,353	1,638	0,73	8,53	5,13	5,248	22 %
GlDH	0,84	0,572	5	2,132	1,533	1,33	5,63	3,76	4,8	40 %
APh	51,2	21,3	5	2,132	1,533	1,49	5,63	3,76	3,749	20 %
Bili	1,47	0,73	6	2,015	1,476	3,258	4,36	3,1	5,9	83 %
Thym.	5,34	3,06	5	2,132	1,533	2,806	5,63	3,76	16,64	60 %
GE	7,0	2,22	5	2,132	1,533	0,503	5,63	3,76	19,7	40 %
Alb.	49,2	5,06	5	2,132	1,533	6,4	5,63	3,76	7,6	100 %
α_1-Glob.	2,86	0,69	5	2,132	1,533	3,7	5,63	3,76	2,07	40 %
α_2-Glob.	7,0	3,67	5	2,132	1,533	0,67	5,63	3,76	17,8	40 %
ß -Glob.	10,1	0,95	5	2,132	1,533	3,2	5,63	3,76	1,09	20 %
γ -Glob.	30,2	6,58	5	2.132	1,533	5,06	5,63	3,76	22,0	100 %

Signifikant pathologisch sind die Werte der PsChE, des Bilirubins und die der Albumine und Gamma-Globuline. Hinzu kommt noch die erhöhte LDH.

Zur Beurteilung des diagnostischen Wertes der jeweiligen klinisch-chemischen Untersuchung werden die signifikante Abweichung des Mittelwertes der Stichprobe von dem der Normalverteilung und die Prozentzahl der Fälle, die unter oder über der 2 s-Grenze der Normalverteilung liegen, bestimmend.

Die PsChE-Aktivität im Serum von Patienten mit Lebercirrhose und nicht therapierter dekompensierter Rechtsherzinsuffizienz ist unter anderem signifikant erniedrigt. Bei Therapie der Rechtsherzinsuffizienz scheint die PsChE-Aktivität schnell zur Norm zurückzukehren, wie sich die Leberdurchblutung verbessert.

Bei einem Fall von posthepatitischer Lebercirrhose mit konstanter Proteinurie konnten die Untersuchungen Stefenellis (201) bestätigt werden, daß die PsChE-Aktivität normal oder sogar erhöht sein kann.

Bei einem Kind mit Cirrhose nach Amöbenhepatitis, bei einer hochgradigen Fettleber, sowie bei einem Fall mit Cholelithiasis war die PsChE-Aktivität stark pathologisch.

Bei acht Fällen von Karzinomen verschiedenen Ursprungs war eine pathologische PsChE-Aktivität nachweisbar.

Abschließend ist zu sagen, daß die PsChE-Aktivität in jedem Fall hochgradig gestörter Leberfunktion pathologisch ist. Sie steigt sofort wieder an, wenn die Ursache des Schadens beseitigt wird (Rückgang der Hepatitis, Verbesserung der Durchblutung bei chronischer Stauung), bleibt aber pathologisch, wenn der Schaden zunimmt oder nicht behoben werden kann (chronische Hepatitis, Cirrhose, Carcinom).

Zu 14 m):

Die Möglichkeit der schnellen Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum zum Nachweis der Vergiftung mit ChE-Hemmstoffen bedeutet einen großen Gewinn für die Praxis und kann lebensrettend sein, weil die Gabe von Toxogonin bei Polyalkylphosphatvergiftungen nur anfangs nützlich sein kann (62, 63, 211). Hierbei ist der Nachteil des möglichen Irrtums unbedeutend. Bei keiner Erkrankung fanden wir solch niedrige PsChE-Aktivität wie bei der lebensbedrohlichen Vergiftung.

Bei einem Patienten mit der für "Dibucain-Resistenz" homozygoten PsChE-Variante ergab sich eine Aktivität von 1 - 1,4 U/ml.
Nach Goedde und Schoepf kommt dieser Typ einmal unter 2 500 - 4 000 vor (84).

Die Kombination Vergiftung und homozygot für "Dibucain-Resistenz" ist schon sehr selten anzunehmen.
Bemerkt sei noch, daß wir bei lebensbedrohlicher Vergiftung niemals so hohe Werte für PsChE-Aktivität fanden.
Sehr unwahrscheinlich ist die Kombination Vergiftung und "silent gen"-PsChE-Variante. Diesen Typ gibt es einmal unter 10 000 (85). Wir fanden bei einer Patientin, die wahrscheinlich diese Anlage besitzt, nach unserer Methode eine Aktivität von 0,42 U/ml. Damit ist wohl eine Fehldiagnose lebensbedrohlicher ChE-Hemmstoff-Vergiftung kaum möglich. Der forensische Nachweis hat natürlich über die EChE-Aktivität und die chromatographische Darstellung des Giftes zu erfolgen.

Über PsChE-Varianten in der Klinik
zu 15.:

Wir hatten besonderes Glück bei der Suche nach PsChE-Varianten. Beide Patienten hatten postoperativ eine mehrstündige Apnoe nach Succinylgabe. Bei beiden konnte die Diagnose sofort gestellt werden anhand einer einmaligen Bestimmung der PsChE-Aktivität. Das Serum des Patienten mit der "dibucain-resistenten" Variante hatte eine Aktivität von 0,66 U/ml, das der Patientin mit der "silent gen"-Variante von 0,42 U/ml bei normaler EChE. Die Patientin wurde unter gleichen Verhältnissen von ihrem ersten Kind entbunden. Die PsChE-Aktivität des jetzigen Neugeborenen war mit 1,9 U/ml nicht erniedrigt. Der Wert kann für ein Neugeborenes durchaus normal sein. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß das Kind heterozygot für die "silent gen"-Variante ist und nur die Hälfte der normalen PsChE-Aktivität besitzt.

Zu 16., 17. und 18.:

Mit Hilfe des Serums des Patienten Hal. Ber. und des Serums einer gesunden Person, deren PsChE dem Intermediär-Typ entspricht, also heterozygot für die "dibucain-resistente" Variante ist, konnten wir eine sehr genaue Studie über die Hemmung der drei PsChE-Typen nach Kalow (141) mit verschiedenen Dibucain-Konzentrationen anfertigen. Der Wert der damit entwickelten Methode zur photometrischen Bestimmung der Dibucainzahl ist groß. Mit einem geringen Aufwand an Zeit und Material läßt sich feststellen, ob ein Patient Succinylcholin verträgt oder nicht. Zusätzlich ist es dem Chirurgen möglich, den Funktionszustand der Leber zu beurteilen. Die angegebenen Normalwerte für die

Dibucainzahl sind so lange maßgeblich, bis mit der Methode eine sehr große Population untersucht worden ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Literaturteil dieser Arbeit werden zunächst zwei Gruppen von Cholinesterasen unterschieden, wobei deutlich gemacht wird, daß Acetylcholinesterase (gleichzusetzen mit Erythrozytencholinesterase) als Substrat Acetate der Cholin- und Nichtcholinester optimal, Butyrylcholin (BuCh) und Benzoylcholin (BeCh) nicht umsetzt, während die für diese Arbeit wichtige Pseudocholinesterase (PsChE) oder Cholinesterase II BuCh und BeCh optimal spaltet. So wird bewiesen, daß eine Bestimmungsmethode für PsChE entweder BuCh oder BeCh oder ähnliche als Substrat benutzen muß, um einwandfrei PsChE-Aktivität nachweisen zu können.

Als Hauptsyntheseort der PsChE kommt nur die Leber in Frage. Das Enzym wird ähnlich wie Albumin von der Leberzelle produziert und ins Blut abgegeben.

Es folgt eine Zusammenstellung über den Wert der PsChE-Aktivitätsbestimmung im Serum für die Klinik. Dabei wird deutlich, daß eine neuzeitliche Diagnostik der Leberfunktion nicht mehr auf die PsChE als Parameter der Aktivität der Leberzelle verzichten kann. Außerdem werden sämtliche genetisch bedingte Varianten der PsChE aufgezeigt, um eine Notwendigkeit für eine einfache photometrische Bestimmung der Dibucainzahl darzustellen, aber auch deshalb, weil die Erforschung der Vererbung der PsChE-Varianten sehr große Erfolge für den Genetiker und Pharmakologen zeitigte, zumal die Verhältnisse noch nicht völlig geklärt sind.

Über das Problem der Vergiftung mit Cholinesterasehemmstoffen wird kurz berichtet, da eine schnelle und einfache Bestimmungsmethode der PsChE-Aktivität die Diagnose "Vergiftung durch Cholinesterasehemmstoff" in kurzer Zeit erhärten hilft.

Anschließend werden die Eigenschaften des Serumenzyms ausführlich beschrieben. Anhand des Mechanismus der Hemmung der Cholinesterasen durch bestimmte Stoffe wird klar, wie ein "aktives Zentrum" eines Enzyms aussehen muß. Zur Vollständigkeit gehört auch die Zusammenstellung verschiedener Meinungen über die Kinetik der Cholinesterasen, den Einfluß von Wasserstoffionenkonzentration und Temperatur auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

Sehr ausführlich wird auf die bisher angewandten Methoden zur Bestimmung der PsChE-Aktivität im Serum und Gewebe eingegangen. Die anschließende Diskussion verdeutlicht die Notwendigkeit für eine einfache, schnelle, gut reproduzierbare und substratspezifische Methode.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird zunächst beschrieben, wie es zur Entwicklung einer neuen Methode kam. Die Methoden werden verglichen, die AThCh und BeCh als Substrate verwenden, die bisher besten Methoden. AThCh ist ein bevorzugtes Substrat der EChE (AChE) und somit recht unspezifisch zum Nachweis von PsChE-Aktivität. Die Substrate BuThCh und AThCh werden am Enzym der Erythrozyten verglichen. Danach ist erwiesen, daß BuThCh das Substrat ist, das optimal und selektiv von der PsChE hydrolysiert wird.

Versuche mit verschiedenen Puffern und verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen haben zum Ergebnis, daß entweder TRIS-Puffer oder einfache Phosphatpuffer mit einer Ionenstärke von 0,1 zwischen einem pH von 7,2 und 7,8 geeignet sind. Bei einer Wasserstoffionenkonzentration unter 10^{-8}M wird das Farbreagens, der SH-Gruppenindikator DThbNBS scheinbar instabil.
Der Extinktionskoeffizient für die Farbentwicklung mit DThbNBS und frischem Glutathion wurde gefunden mit $\varepsilon = 13{,}3 \times 10^{-6}$ Mol^{-1} cm^2.

Untersuchungen über das Verhältnis von Substratkonzentration und Hydrolysegeschwindigkeit ergaben die optimale Substratkonzentration von ca. 5×10^{-3}M BuThCh im Ansatz.
Die graphische Darstellung der Ergebnisse nach der Gleichung von Michaelis und Menten ergibt keine Geraden. Die PsChE scheint nicht diesem Gesetz zu gehorchen.
Die neue Methode arbeitet mit der Serumverdünnung von 1 : 270, 5×10^{-3}M BuThCh im Ansatz, 0,00027 M DThbNBS und einem Phosphatpuffer von 0,05 M und pH 7,2 bei 25°C. Die Farbentwicklung wird bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Die erhaltenen Werte sind gut reproduzierbar. Eine Veränderung der Temperatur von 20°C auf 40°C bringt einen Aktivitätszuwachs von ca. 50%, also ist genaues Einhalten der Temperatur Bedingung. Messungen, sofort und 10 min nach Hinzugabe des Serums zum Ansatz, ergeben eine Konstanz der Hydrolysegeschwindigkeit über 10 min mit einem Verlust von ca. 4%, dadurch wird es möglich, mehrere Bestimmungen hintereinander anzusetzen und abzulesen.

Die Methode wird erweitert durch die Bestimmung der Dibucainzahl, um Individuen zu entdecken, die das Muskelrelaxans SuCh nicht abbauen können. Zu-

nächst wird mangels eines Serums mit atypischer PsChE die Konzentration Dibucain gesucht, die normale PsChE zu ca. 80% hemmt. Diese liegt bei der oben beschriebenen Methode bei 5×10^{-5}M Dibucain.

Von gesunden Personen wurden PsChE Aktivitäten und Dibucainzahlen bestimmt. Die Normalwerte sind:

$$\bar{x} \pm 2s = 2,6 - 6,9 \text{ U/ml}$$

$$DN = 70 - 80$$

Werden die Bedingungen verändert, (6×10^{-3}M BuThCh, pH = 7,7) liegen die obigen Werte um ca. 13% höher. Die bereits konfektioniert erhältliche Methode, die mit letzteren Bedingungen arbeitet, hat Normalwerte von:

$$\bar{x} \pm 2s = 3,0 - 8,0 \text{ U/ml}$$

Die zuletzt genannte Arbeitsweise wird zur klinischen Prüfung der Methode angewendet. Bei sieben Fällen mit akuter Hepatitis werden täglich Verlaufskontrollen gemacht. Die PsChE-Aktivität sinkt bei Beginn der Erkrankung meist unter den Normbereich ab, um unterschiedlich schnell zur Norm zurückzukehren. Chronische Hepatitis und Lebercirrhose lassen sich dadurch erkennen, daß die Aktivität pathologisch bleibt oder noch mehr absinkt. Eine einmalige Bestimmung bei chronischer Hepatitis, kompensierter und dekompensierter Lebercirrhose, sowie bei noch nicht therapierter chronischer Leberstauung ergaben signifikant pathologische Werte für folgende klinisch-chemische Untersuchungen

chronische Hepatitis: SDH, Elektrophores, SGPT, SGOT, GlDG, Alk. Ph, Thymoltrübung und Bilirubin;

dekompensierte Lebercirrhose: PsChE, SGOT, GlDH, Bilirubin, Thymoltrübung, Elektrophorese;

dekompensierte Rechtsherzinsuffizienz: PsChE, Bilirubin, Elektrophorese, LDH.

Eine Anzahl von Einzelfällen (Lebercirrhose mit Proteinurie, Lebercirrhose nach Amöbenhepatitis, hochgradige Fettleber, Cholelithiasis) wurden untersucht. Bei sechs Fällen von Carcinomen verschiedenen Ursprungs und zwei von Magencarcinom ohne Metastasen war eine deutliche Senkung der PsChE-

Aktivität nachweisbar, während andere klinisch-chemische Befunde unterschiedlich pathologisch ausfielen.
Es werden vier Fälle mit Parathionvergiftung vorgestellt. Die Bestimmung der PsChE-Aktivität mit BuThCh als Substrat erwies sich hier als ausreichend zur Diagnose und Verlaufskontrolle.
Ein Fall von homozygot "dibucain-resistenter" Variante wird beschrieben.
Vermutlich eine "silent gen"-PsChE-Variante wurde bei einer Patientin gefunden, die eine längere Apnoe nach SuCh-Gabe hatte.
Anhand eines Serums mit homozygot atypischer PsChE, eines Serums, das dem Intermediärtyp entspricht und eines Normalserums wird diejenige Dibucainkonzentration ermittelt, die nötig ist für eine Methode zur Bestimmung der Dibucainzahl und zur optimalen Unterscheidung der drei Typen. Die Arbeitsweise für die Bestimmung der Dibucainzahl mit 5×10^{-5}M Dibucain im Ansatz wird beschrieben.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Abderhalden, E. u. H. Paffrath: Fermentforschung 8, 229 (1926)

(2) Albus, G.: Über die Aktivität der Histaminase und der Cholinesterase beim latenten Allergiker. Klin. Wschr. 18, 858 (1939)

(3) Aldridge, W.N.: Biochem. J. 57, 692 (1954)

(4) Alles, G.A. and R.C. Hawes: J. biol. Chem. 133, 375 (1947)

(5) Ammon, R. in: Erg. Fermentforschung 9 (1943)

(6) - u. H. Kwiatkowski: Pflügers Arch. 234, 296 (1934)

(7) - u. G. Voss: Manometrische Bestimmung der Serumcholinesterase. Pflügers Arch. ges. physiol. Menschen, Tiere 235, 393 (1935)

(8) - u. F.J. Zapp: Klin. Wschr. 33, 759 (1955)

(9) Antopol, W., A. Schifrin and L. Tuchman: Decreased cholin esterase activity of serum in jaundice and biliary disease. Proc. Soc.Exper. Biol. Med. New York 38, 363 (1938)

(10) Arroyave, G., R. Feldman and N.S. Scrimhaus: Serum cholin esterase levels in central american children in relation to nutrititional status. Amer. J. Chim. Nutr. 6, 164 (1958)

(11) Augustinsson, K.-B.: Arch. Biochem. 23, 111 (1949)

(12) - : A titrimetric method for the determination of plasma and red cell cholin esterase activity using the thiocholin esters as substrats. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, 284, (1955)

(13) - and J.E. Casida: Biochem. Pharmacol. 3, 60 (1959)

(14) - , T. Fredrikson, A. Sundwall and G. Jonsson: Biochem. Pharmacol. 3, 68 (1959)

(14a) Augustinsson, K.-B., Jonsson and B. Sparrman: Acta chem. Scand. 15, 11 (1961)

(15) Baitsch, H., H.W. Goedde u. K. Bross: Klinik und Genetik der Pseudocholinesterasen (3.1.1.8.) Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 70, 531 - 36 (1964)

(16) Baldridge, H.D. jr., W.J. McCarille and S.L. Friess: Am. Soc. 77, 739 (1955)

(17) Barbosa Hargreaves A. u. H.G. Da Silva: Titrimetrische Bestimmung der Cholinesterase im Blutserum. Hospital, Rio de Janeiro 55, 99 - 106 (1959)

(17a) - : Arch. Biochem. 57, 41 (1955)

(18) Barsomu and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) 85, 12 (1935)

(19) Bergmann, F., I.B. Wilson u. D. Nachmansohn: J. biol. Ch. 186, 693 (1950)

(20) - u. A. Shimon: Biochem. biophys. Acta 8, 347, 520; 9, 473 (1953)

(21) - , R. Segal, A. Shimoni u. M. Wurzel: Biochem. J. 63, 684 (1956)

(22) - : Adv. Catalysis 10, 130 (1958); Expos. ann. Biochim. méd. 21, 1 (1959)

(23) - , R. Rimon u. R. Segal: Biochem. J. 68, 493 (1958)

(24) Benstz, W.: Therapie des Monats, 8, 126 (1958)

(25) Bernsohn, J., K.D. Barron and A. Hess: Cholin esterases in Serum as demonstrated by Starch Gel Electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. New York 108, 71 (1961)

(26) Bertrand, J.: C.R. Soc. Biol. Paris, 148, 1912 (1954)

(27) Best and McHenry: J. Physiol. (Brit.) 70, 349 (1930)

(28) Beznak, A.B.L.: Nature, London 181, 1190 (1958)

(29) Bockendahl, H.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 336, 172 (1964)

(30) Bourne, J.G., H.O.G. Collter and A.F. Somers: Lancet 1952 I, 1225

(31) Bovet-Nitti, F.: R.C. Ist. sup. Sanitá 12, 138 (1949)

(32) Brauer, R.W. and M.A. Root: Liver injury and its influence upon the acethylcholin splitting activity of rat and dog. Fed. Proc. 5, 168 (1946)

(33) - and M.A. Root: J. Pharmacol. Exper. Therap. 88, 109 (1946)

(34) Breuer, H., M. Schönfelder u. H.W. Schreiber: Klin. Wschr. 39, 1189 (1961)

(35) - - u. E. Raschke: Langenbeck Arch. Clin. Chir. 297, 453 (1961)

(36) Broser, F.: Nervenarzt 35, 49 (1964)

(37) Brouwer, B.B.: Thesis 1957, University of Leyden, The Netherlands

(38) Burgen, A.S.V. and F.C. McIntosh: Neurochem. 35, 311 (1955)

(39) Burn, J., H. Kordik and R.H. Mole: Effect of X-irradiation on the cholin esterase in rat intestine. J. Physiol. 116, 5 (1952)

(40) Burnett, W.: Der Wert der Serumcholinesterase-Bestimmung als Leberfunktionsprobe und für die Diagnose Gelbsucht. Gut. 1, 294 - 302 (1960)

(41) Butt, H.R., M.W. Comfort, Th. J. Dry et al: Values for acetyl cholin esterase in the blood serum of normal persons and patients with various disease. J. Lab. clin. Med. 27, 649 (1942)

(42) Cajori, F.A. and H.M. Vars: The effect of chloroform anaesthesia on serum amylase and liver esterase. Am. J. Physiol. 124, 49 (1938)

(43) Capps: Amer. J. Dis. Child. 89, 701 - 716 (1955)

(44) Cécile, J.: Les cholinestérases sanguines. Leur constance individuelle dans le temps. Bull. Acad. Méd. Paris 143, 30 (1959)

(45) v. Clarmann, M.: Richtlinien über die Behandlung akuter Alkylphosphatvergiftungen. Dtsch.med. Wschr. 88, 2206 - 2207 (1963)

(46) Clitherow, J.W., M. Mitchard and N.J. Harper: Nature, London 199, 1000 (1963)

(47) Cohen, J.A. and H.H. Jansz: Disc. Faraday Soc. 20, 114 (1955)

(48) - , R.H. Oosterbaan u. M.G.R.J. Warrings: Arch. int. Physiol. 62, 574 (1954)

(49) Cunningham, L.W.: Science 125, 1145 (1957)

(50) Dale, H.H.: The action of certain esters and ether of cholin and their relation to muscarin. J. Pharmacol. Exper. Therap. 6, 147 (1914/15)

(51) Davies, R.O., A.V. Marton and W. Kalow: The Effect of the normal and atypical human serum cholin esterase on a group of esters of cholin. Canad. Biochem. 38, 545 (1960)

(52) Doenicke, A., Th. Gürtner, G. Kreutzberg, I. Remes, W. Spiess u. K. Steinbereithner: Serum cholin esterase and enzymia. Acta anesth. scand. 7, 59 (1963)

(53) - u. F. Holle: Das Verhalten der Leberfunktion im postoperativen Schock. Fortschr. Med. 80, 253 (1962)

(54) - u. St. Schmidinger: Med. Klinik 60, 2012 (1965). Der diagnostische Wert der Serumcholinesterasebestimmung.

(55) Drabkin, D.L. and J.B. March: J. biol. Chem. 212, 623 (1955)

(56) Dulce, H.J.: Hohe Verminderung der Cholinesterase-Aktivität im Serum bei Leberschädigungen. Zschr. inn. Med. 4, 174 (1949)

(57) Ellmann, G.L.: Tissue sulphydryl groups. Arch. Biochem. biol. 82, 70 (1959)

(58) - , D.K. Cortney, V. Andres jr. and R.M. Featherstone: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin esterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88 (1961)

(59) Engelhardt, G., G. Hahn u. F. Sakai: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 49 (1959)

(60) Engelhardt, G., G. Hahn u. F. Sakai: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmak. 237, 696 (1959)

(61) Erbslöh, F. u. H.L'Allemand: Dtsch. med. Wschr. 90, 800 (1965)

(62) Erdmann, W.D. u. M.v. Clarmann: New Esterase Reactivator (LüH 6) in the Treatment of Alkylphosphat-Poisoning. Dtsch. med. Wschr. 88, 2201 (1963)

(63) - u. H. Engelhard: Pharmakologisch-toxokologische Untersuchungen mit dem Dichlorid des Bis(4-hydroxyiminomethyl-pyridium-1-methyl)-äthers, einem neuen Esterase-Reaktivator. Arzneimittelforschung 14, 5 - 11 (1964)

(64) - Möglichkeiten und Grenzen der Behandlung von Vergiftungen mit sogenannten Nervengasen. Wehrmedizin Heft 8, Band 4, S. 150 - 57 (1966)

(65) Evans, F.T., P.W.S. Gray, H. Lehmann and E. Silk: Brit. med. J. 1953 I, 136

(66) - , P.W.S. Gray, H. Lehmann and E. Silk: Lancet 1952 I, 1229

(67) Faber, M.: Serum cholin esterase in patients with proteinuria. Acta med. scand. 115, 475 (1943)

(68) - : The relationship between serum cholin esterase and serumalbumin. Acta med. scand. 114, 72 (1943)

(69) Fleischmann, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 62, 518 (1910)

(70) Forbat, A., H. Lehmann and E. Silk: Lancet 1953 II, 1067

(71) Fraser, P.J.: Brit. J. Pharmacol. 11, 7 (1956)

(72) Frémont-Smith, K., W. Volwiler and P.A. Wood: Serum acetyl cholin esterase. J. Lab. Clin. Med. 40, 692 (1952)

(73) Friess, S.L. u. W.J. McCarrille: Am. Soc. 76, 1363, 2260 (1954)

(74) - , A.A. Patchett u. B.Witkop: Am. Soc. 79, 459 (1957)

(75) Frommel, E., M. Thalheimer, A.D. Herschberg et al.: Choc traumatique et cholinestérase serique. Le rôle médiateur de l'acéthylcholin dans la pathogénie du choc. Helvet. physiol. pharmacol. Acta 1, 451 (1943)

(76) Gal, E.M. and E. Roth: Spectrometric methods for determination of cholin esterase activity. Clin. Chim. Acta 2, 316 (1957)

(77) - : Cholinesterase-Aktivität von Gesunden und Schizophrenen. Nature, London 198, 1119 (1963)

(78) Garry, P.J. and J.I. Routh: A micro method for determination fo serumcholin esterase. Clin. Chem. 11, 91 (1965)

(79) Geldmacher, M., v. Mallinckrodt u. I. Kaiser: Die Verwendung von o-Nitrophenylbutyrat als Fehlerquelle bei der Messung der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM. Z. klin. Chem. u. klin. Biol. 6, 1968, Heft 3.

(80) Girardier, L., F. Baumann et J. M. Posternak: Helv. phys. Acta 18, 467 (1960)

(81) Gitlin, D., J. Cravioto, S. Frenk et al.: Albumin metabolism in children with protein malnutrition. J. Clin. Invest. 37, 682 (1958)

(82) Gitman, L., J. Greenblatt and N. Mitchell: Serum cholin esterase in hyperthyreoidism. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. New York 71, 179 (1949)

(83) Goedde, H.W., K. Altland u. K. Bross: Dtsch. med. Wschr. 88, 2510 (1963)

(84) - u. E. Schoepf: Med. Klinik 59, 1849 (1964)

(85) - , W. Fuss, H. Ritter u. H. Baitsch: Humangenetik 1, 311 (1965)

(86) - , D. Gehring u. R.A. Hofmann: Untersuchungen zur Biochemie und Genetik verschiedener Azylcholin-Acylhydrolase-Varianten. Federation of European Biochem. Soc. 2. Meeting, Wien 21. - 24. April 1965.

(87) Goedde, H.W., Ch. Held, St. Schmidinger u. K. Altland in

(88) - , A. Doenicke u. K. Altland: Pseudocholinesterasen, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1967

(89) Goldner, M.G. and M. Morse: Studies on serum cholin esterase. The Serum cholinesterase in liver disease. J. Lab. clin. Med. 34, 858 (1949)

(90) Goll, K.H.: Dtsch. Gesundh.-Wes. 17, 950 (1962)

(91) Gomorri, G.: Proc. Soc. exp. Biol. New York 68, 354 (1948)

(92) - : Int. Rev. Cytol. 1, 323 (1952)

(93) - : Microscopic. Histochim. Chicago Univ. Press 1952

(94) - : J. Lab. clin. Med. 42, 445 (1953)

(95) Gordon, R.S. jr.: Lancet 1959 I, 325

(96) Goto, J.: J. Exper. Med. 55, 87 - 94 (1951)

(97) Green, N.: J. biol. Chem. 205, 535 (1953)

(98) Grob, D., J.L. Lilienthal jr., A.M. Harvey et al.: The administration of di-isopropyl-fluorophosphate (DFP) to man. Bull. John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)

(99) - , R.J. Johns and A.M. Harvey: Amer. J. Med. 19, 684 (1955)

(100) - , and R.J. Johns: Bull. John Hopk. Hosp. 99, 115 (1956)

(101) De Grouchy, J.: Rev. franc. Etud. clin. biol. 3, 881 (1958)

(102) Gürtner, Th., G. Kreutzberg u. A. Doenicke: Comparative studies on cholin esterase activity in serum and in liver cells. Acta anaesth. scand. 7, 69 (1963)

(103) - u. G. Kreutzberg: Leber, Haut und Skelett. S. 247, Stuttgart, Georg Thieme 1964

(104) - u. F. Holle: Langenbecks Arch. klin. Chir. 309, 224 (1965)

(105) Gürtner, Th.: Habilitationsschrift München 1966

(106) Hardegg, W.: Habilitationsschrift Heidelberg 1958, Die Kinetik der Cholinesterasen.

(107) - , D. Bechinger u. R. Dohrmann: Pflügers Arch. 263, 33, (1956)

(107a) - : Cholinesterasen, in Hoppe-Seylers/Thierfelder, "Hdb. d. physiol.- und pathol.-chem. Analyse" 10. Auflage 6. Band, Teil 3, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1966, S. 921 ff.

(108) Harris, H.: Heart 14, 161 (1927)

(109) - , M. Whittaker: Unterschiedliche Hemmung der menschlichen Serumcholinesterase mit Fluorid: Erkennung von zwei neuen Phänotypen. Nature, London 191, 494 (1961)

(110) - , D.A. Hopkinson and E.B. Robson: Nature, London 196, 1296 (1962)

(111) - and M. Whittaker: Ann. human. Genet. 27, 53 (1963)

(112) - , D.A. Hopkinson, E.B. Robson and M. Whittaker: Genet. Studies in a new serum cholin esterase variante, detected by electrophorese. Ann. hum. Genet. 26, 359 (1963)

(113) - , E.B. Robson, A.M. Gle-Bott and J.A. Thornton: Beweis für Nicht-Allelismus zwischen Genen, die die Serumcholinesterase beeinflussen. Nature, London 200, 1185 (1963)

(114) Haus, W.H. u. H.J. Leppelmann: Klin. Wschr. 35, 65 (1957)

(115) - - : Klin. Wschr. 35, 71 (1957)

(116) - - u. H. Plänitz: Klin. Wschr. 35, 957 (1957)

(117) Hazard, R., et M. Dérot: Evaluation de la procainesterase sanguine au cours des affections thyréioidienne. Presse méd. 82, 114 (1949)

(117a) Heilbronn, E. : Acta chem. scand. 12, 1879 (1959)

(118) - : Acta chem. scand. 13, 1255 (1959)

(119) - : Acta chem. scand. 16, 516 (1962)

(120) Heim, F. : Klin. Wschr. 63, (1944)

(121) - : Änderungen der Serumcholinesterase-Aktivität in der Anaphylaxie. Klin. Wschr. 24/25, 115 (1946)

(122) - u. A. Ruete: Serumcholinesterase und Blutzuckerwerte bei einigen insbesondere allergie-bedingten Hauterkrankungen. Klin. Wschr. 24/25, 86 (1946)

(123) Hein, G.E., R.M. Krupka u. K.J. Laidler: Nature 193, 1155 (1962)

(124) Heinecker, R. u. I. Mayer: Das Verhalten der Serumcholinesterase nach Myokardinfarkt. Klin. Wschr. 35, 340 (1957)

(125) Herzfeld, E. u. Ch. Stumpf: Ein neuer Kurztest zur Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität. Wien, Klin. Wschr., 67, 874 (1955)

(126) Hestrin, S. : The reaction of acetylcholin and other carboxylic acid derivates with hydroxylamine and its analytical application. J. biol. Ch. 180, 249 (1949)

(127) - : J. biol. Chem. 180, 879 (1949)

(128) - : Biochim. biophys. Acta 4, 310 (1950)

(129) Hicks, C. St. and M.E. Mackay: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 14, 275 (1936)

(130) Holle, F.: Z. ges. exp. Med. 115, 107 (1949)

(131) - , K.H. Stahm u. W. Teufel: Anästhesist 3, 113 (1954)

(132) - u. A. Doenicke: Ergeb. Chir. Orthop. 43, 77 (1961)

(133) Hoskin, F.C.G. and G.S. Trick: Candad. J. Biochem. 33, 969 (1955)

(134) de la Huerga, J., Ch. Yesinick u. H. Popper: Colorimetrische Messung der Aktivität der Serumcholinesterase, eine Modifikation nach dem Verfahren von S. Hestrin. Amer. J. clin. Pathol. 22, 1126 (1952)

(135) Hunt, A.H. u. H. Lehmann: Serumalbumin, Pseudocholinesterase und die Transaminasen zur Bewertung der Leberfunktion vor und dann nach venösen Shunt-Operationen. Gut. 1, 303 - 311 (1960)

(136) Jansz, H.S., D. Brons and M.G.P.J. Warringa: Biochim. biophys. Acta, Amsterdam 34, 573 (1959)

(137) Jokay, J. u. A. Kiss: 8. Meeting Sect. Immun. Hung. Assoc. Microbiol. (1961)

(138) Kahlson, G. and S. Renvall: Acta physiol. scand. 37, 159 (1956)

(139) Kaiser, H. u. Th. Haag: Zum chemischen-toxikologischen Nachweis von E 605 (Bayer) sowie anderer Insecticide der Thiophosphorsäurereihe. Arch. d. Pharm. 289/61 542 - 597 (1956)

(140) - : Zur Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten unter Berücksichtigung des neuen Esterase-Reaktivators "Toxogonin". Dtsch. Apotheker-Zeitung 14, 431 - 433 (1964)

(141) Kalow. W. and K. Genest: Eine Methode zur Aufdeckung von atypischen Formen der Serumcholinesterase. Bestimmung der Dibucainzahl. Canad. J. Biochem. 35, 339 (1957)

(142) - and N. Staron: Über die Verteilung und Vererbung der atypischen Formen der menschlichen Serumcholinesterase wie sie angezeigt werden durch die Dibucainzahl. Canad. J. Biochem. 35 1305 (1957)

(143) - and R.O. Davies: The activity of different esterase inhibitors against the atypical human serum cholin esterase. Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1959)

(144) Kalow, W.: Anesthesiology 20, 505 (1959)

(145) - : Pharmacogenetics, Philadelphia and London: W.B. Saunders Co. 1962

(146) Kaufmann, K.: Serumcholinesterase in the normal individual and in people with liver disease. Ann. Int. Med. 41, 533 (1954)

(147) Kekwik, R.G.O.: Serum cholinesterase activity in health and liver disease. Biochem. J. 76, 420 (1960)

(148) Kellen, J.: Bedeutung der Serumcholinesterase für das Blutspendewesen, Wien., Klin. Wschr. 73, 34 (1961)

(149) Klaus, P. u. H. Reuschler: Essentielle Hypocholinesteraseämie. Klin. Wschr. 38, 439 - 443 (1960)

(150) van der Kloot, W.G.: J. gen. Physiol. 48, 575 (1958)

(151) Knedel, M.: Verhandlungen der dtsch. Gesellschaft für Innere Medizin. (1967)

(152) Koch-Weser, D., J. de la Huerga, H. Popper: Relation between serum and hepatic enzymes in experimental liver damage. J. Lab. Clin. Med. 38, 825 (1956)

(153) Koeffler, H.: Med. Klinik 53, 17 (1958)

(154) Koelle, G.B. and J.S. Friedenwald: A histochemical Method of Localizing Cholin esterase Activity. Proc. Soc. exper. Med. 70, 617 - 622 (1949)

(155) - : Histochemical Differenciation of Types of Cholin esterase and their Localization in Tissues of the cat. J. Pharmacol. 100, 158 - 179 (150)

(156) - : Handbuch der experimentellen Pharmakologie, gegr. v. A. Heffter, fortgef. v. W. Heubner, Ergänzungswerk hrsg. O. Eichler u. A. Farah, 15. Bd. Cholinesterases and Anticholinesterases reagents.
Sub-Editor G.B. Koelle, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 89-128, (1963)

(157) Køllegard, J.: Acta chir. scand. 114, 145 (1958)

(158) Kommerell, B. u. F.H. Franken: Über Serumcholinesterase-Aktivität bei Lebererkrankungen. Dtsch. med. Wschr. 81, 1959 - 61, (1956)

(159) Krupka, R.M. and K. Laidler: Amer. Soc. 83, 1445, 1448, 1454, 1458 (1961)

(160) - - : Nature 190, 916 (1961)

(161) - - : Amer. Soc. 81, 1445, 1454, 1458 (1961)

(162) - : Canad. J. Biochem. 42, 677 (1964)

(163) Kunkel, H.G. and S.M. Ward: Plasma esterase activity in patients with liver disease and the nephrotic syndrome. J. exper. Med. 86, 325 (1947)

(164) Lakos, T., L. Csinady and T. Kovacs: Acta physiol. Acad. Sci. 16, Suppl. 44 (1959)

(165) LaMotta, R.V., H.M. Williams and H.J. Wetstone: Serum cholin esterase in hepatitis and cirrhosis. Gastroenterology 33, 50 (1957)

(166) Lang, W. u. G. Intsesuloglu: Klin. Wschr. 40, 312 (1962)

(167) - : Münch. med. Wschr. 33, 1598 (1963)

(168) Lehmann, H. and E. Silk: Brit. med. J. 1953 I, 767

(169) - and E. Ryan: Lancet 1956 II, 124

(170) - , J. Lidell, B. Blackwell, D.C. O'Connor and A.V. Daws: Brit. med. J. 1963 I, 1116

(171) Levine, M.G. and R.E. Hoyt: Science 111, 286 (1950)

(172) - and A.A. Suran: Further studies on relationship between human serum cholinesterase and serum albumin. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. New York 79, 686 (1952)

(173) Lidell, J.V., H. Lehmann and E. Silk: A "silent" pseudocholin esterase gen. Nature London 193, 561 (1962)

(174) - - , D. Davies and A. Sharin: Lancet 1962, I, 3463

(175) - - D. Davies: Acta genet. (Basel) 13, 95 (1963)

(176) Linke, A.: Dtsch. Gesundh.-Wes. 16 (1961), 1019

(177) Lippmann, R.W., H.U. Martin and E. Jacobs: Arch. Path. Chicago 54, 169 (1952)

(178) Loewi, O. u. E. Navratil: Pflügers Arch. ges. Physiol. 214, 678 (1926)

(179) Lundine, J., C.-J. Clemedson and A. Nelson: Early affects of whole body irradiation on cholin esterase activity in guinea-pig's blood, with special regard to radiation sickness. Acta radiologica 48, 52 (1957)

(180) Lüthy, H.: Serumcholinesterase der Maus nach Röntgenbestrahlung. Radiol. Clin. 22, 491 (1953)

(181) Lutterotti, A.: Leberschädigung bei Vergiftungen mit Insecticiden aus der Reihe der Cholinesterase-Blocker. Med. Welt 2430 - 32 (1961)

(182) Lüttringshaus, A. u. J. Hagedorn: Quartäre Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze. Das Dichlorid des Bis-(4-hydroxyiminomethyl-pyridium-1-methyläthers) (Lü H 6), ein neuer Reaktivator der durch organische Phosphorsäureester gehemmten Acetylcholinesterase. Arzneimittelforschung 14, (1964) 1 - 3

(183) Lutzki, A.: Forschr. Med. 80, 889 (1962)

(184) Maier, E. : Klin. Wschr. 31, 1008 (1953)

(185) - : Klin. Wschr. 31, 41 (1953)

(186) - : Dtsch. med. Wschr. 81, 1674 (1956)

(187) Main, A.R., K.E. Miles u. P.E. Braid: Biochem. J. 78, 769 (1961)

(188) Malmström, B.G., Ö. Levin and H.G. Boman: Acta chem. scand. 10, 1077 (1956)

(189) Mann, J.D., W.D. Manchl, P.L. Eichmann, M.A. Knowlton and J. Sborov: J. Lab. Clin. Med. 39, 543 (1952)

(190) Marnay, A. et D. Nachmansohn: C.R. Soc. Biol. (Paris) 125, 41, 489, 1005 (1937)

(191) - - : J. Physiol. (London) 91, 37 (1938)

(192) McArdle, B.: Am. Int. Med. 41, 533 (1954)

(193) McGeorge, M.: Lancet 1937 I, 69

(194) McOsker, D.E. and L.J. Daniel: A colorimetric micromethod for the determination of cholin esterase. Arch. Biochem. Biophys. 79, 1 (1959)

(195) Meer, C. van der: Nature 171, 78 (1953)

(196) Mendel, B. and H. Rudney: Biochem. J. 37, 59 (1943)

(197) Meyer, A. and W. Wibrandt: Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterasen im menschlichen Blut. Helvet. Physiol. Acta 12, 206 - 216 (1954)

(198) Michel, H.O.: Electrometric method for the determination of red cell and plasma cholinesterase activity. J.Lab. clin. Med. 34, 1564 (1949)
Standard Methods of Clin. Chem. Vol. 3 ed. J. Seligson Academic Press, New York p. 93 (1961)

(199) Molander, D.W., M. Friedmann u. S. LaDue: Colorimetrische Methode zur Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität mit Phenolrot als Indikator. Am. Int. Med. 41, 1139 - 52 (1954)

(200) - L.F. Graver and G.T. Pack: SGOT, Cholinesterase und alkalische Phosphatase beim primären und metastatischen Leber-Ca. Acta Un. int. Cancr. (Louvain) 16, 1478 - 81 (1960)

(201) Mounter, L.A.: Enzymologia 21, 67 (1959)

(202) Myers, D.K.: Biochem. J. 52, 46 (1952)

(203) - : Biochem. J. 62, 556 (1956)

(204) Nachmansohn, D.: Nature, (London) 140, 427 (1937)

(205) - : C.R. Soc. Biol. (Paris) 126, 783 (1937)

(206) - : J. Physiol. (London) 93, 20 (1938)

(207) - : C.R. Soc. Biol. (Paris) 128, 516 (1938)

(208) - : Presse méd. 48, 942 (1938)

(209) - : C.R. Soc. Biol.(Paris) 127, 894 (1938)

(210) Neitlich, H.W.: Erhöhte Plasmacholinesterase-Aktivität und erhöhte Resistenz des Succinylcholins: Eine genetische Variante. J. Clin. Invest. 3, 380 (1966)

(211) O'Brien, R. D.: Phosphoric Inhibitors, New York: Acad. Press 1960

(212) Okinaka, S., M. Schwartz and St. Jarnum: Lancet 1959 I, 327

(213) Oosterbaan, R.A., H.S. Jansz u. J.A. Cohen: Biochem. biophys. Acta 20, 402 (1956)

(214) Ord, M.G. and L.A. Stocken: Biochemical aspects of radiation syndrom. Physiol. Rev. 33, 356 (1953)

(215) Pichler, E.: Arch. Psychiat. Nervenkr. 107, 669 (1938)

(216) Pietschmann, H.: Unterschiede von Aktivitäten der Serumcholinesterase und der Serumglutamatoxalattransaminase bei Erkrankungen der Leber. Wien, Zschr. inn. Med. 41, 409 - 14 (1961)

(217) Pilz, W.: Die photometrische Mikrobestimmung der Serumcholinesterase und der Erythrocytencholinesterase. Klin. Wschr. 36, 1017 - 27 (1958)

(218) - u. H. Hörlein: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 327, 256 (1965)

(219) Pilz, W.: Die Cholinesterasen des menschlichen Serums unter Berücksichtigung neuerer Ergebnisse. Zschr. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 1 - 10 (1967)

(220) Plattner, F. and H. Hintner: Pflügers Arch. ges. Physiol. 225, 19 (1930)

(221) Präuer, H.: Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Hemmung der Serumcholinesterase in vitro und in vivo mit dem kurzwirkenden Prostigmin (Neostigmin) und dem Langzeithemmer Hexamarium. Diss. München (1967)

(222) Reinfrank, R.F. and W.J. Wetstone: Serumcholinesterase bei Hypertension. Bericht von einem Flugschüler. Hartford Hospital Bull. 13, 32 (1958)

(223) Reinzold, J.G., L.G. Touringny and V.L. Yonau: Measurement of serum cholin esterase activity. Am. J. Clin. Pathol. 25, 645 (1953)

(224) Renz: Cholin esterase intraphylaxic. Arch. exper. path. (D.) 198, 385 (1941)

(225) Riechert, W. u. E. Kortner: Ärztl. Prax. 13, 1732 (1961)

(226) Richter, D. and M. Lee: Cholin esterase activity and depression. J. med. Sci. 88, 435 (1942)

(227) - and P.G. Croft: Biochem. J. 36, 746 (1942)

(228) Richterich R.: Klin. Chem. Theorie und Praxis. Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M. 1965 S. 344

(229) - Schweiz. med. Wschr. 9, 263 (1963)

(230) Rusell, D.: J. Path. Bact. 65, 279 (1953)

(231) Sabine, J.C.: Effects of total body irradiation and plutonium injection on cholin esterase of erythrocytes and brain. Amer. J. Physiol. 187, 275 (1956)

(232) Sailer, S. u. H. Braunsteiner: Die Bedeutung der Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität. Wien. Zschr. inn. Med. 40, 172 - 75 (1959)

(233) - - : Über eine neue sehr einfache Methode zur Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 37, 968 - 990 (1959)

(234) Sawyer, C.H. and J.W. Everett: Amer. J. Physiol. 148, 675 (1947)

(235) Sboror, J.: J. Lab. clin. Med., St. Louis 39, 543 (1952)

(236) Schaefer, H.: Pflügers Arch. 249, 405 (1947)

(237) Schaffer, N.K., S.C. May jr. u. W.H. Summerson: J. biol. Ch. 206, 201 (1954)

(238) Schaumann, W.: Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in vitro und Berechnung der Aktivität in vivo nach Vergiftungen mit Alkylphosphaten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 239, 81 (1960)

(239) Schmidt, J.: Die Medizinische 1959: 31. Okt., 44

(240) Shanor, S.P., G.R. van Hess, N. Baart, E.G. Erdös u. F.F. Foldes: The influence of age and sex on human plasma and red cell cholin esterase. Amer. J. med. Sc. 242, 357 - 61 (1961)

(241) Sherlock, S.: Disease of the liver and biliary system. 3. Auflage Oxford 1963

(242) Sleisinger, M.H., T.P. Almy, H. Gilder and G. Perle: J. Clin. Invest. 32, 466 (1953)

(243) Spandolini, D.J.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 55, 171 (1955)

(244) Staudacher, H.L. u. R. Schubert: Klinische Erfahrungen bei Schnelldiagnose und Therapie akuter Alkylphosphatvergiftungen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 73, (1967)

(245) Stedman, E., E. Stedmann and L. Eason: Biochem. J. 26, 2056 (1932)

(246) Simonart, A.: Rev. belg. Sci. méd. 5, 73 - 112 (1933)

(247) Stefenelli, N.: Verh. Schweiz. Ges. Gastroenterologie (1960)

(248) - : Bibl. gastroent. (Basel) 4, 75, (1961)

(249) - u. F. Wewalka: Acta hepato-splenol. 8, 379 - 84 (1961)

(250) - : Die Korrelation zwischen dem Albumingehalt und der Cholinesteraseaktivität des Blutserums und ihrer Beurteilung bei Albuminverlust. Klin. Wschr. 39, 1019 - 22 (1961)

(251) Strehler, E. u. H. Myer: Helvet. med. Acta 19, 555 (1952)

(252) Surgenor, M.D. and D. Ellis: Am. Soc. 76, 6049 (1954)

(253) Svensmark, O.: Effect of sialidase on the electrophoretic properties of human serum cholin esterase. Danish. med. Bull. 8, 28 (1961)

(254) - : Acta physiol. scand. 59 (1963) 378

(255) Szeinberg, A.: J. Pharm. Ass. Israel 9, 672 (1963)

(256) Szerb, J.C., A.E. Neumann and D.F. Brown: Nature (London) 198, 1090 (1963)

(257) Tewari, H.B. and G.H. Bourne: Esp. Cell. Res. 27, 173 (1962)

(258) Thesleff, St.: Acta anaesth. scand. 2, 69 (1958)

(259) Thompson, J.C. and M. Whittaker: J. clin. Path. 18, 811 (1965)

(260) Thorpe: Biochem. J. (Brit.) 24, 602 (1930)

(261) Torack, R.M. and R.J. Barrnett: Exp. Neurol. 6, 224 (1962)

(262) Tsuji, F.J., F.F. Foldes and D.H. Rhodes: Arch. Int. Pharmacodyn. 104, 146 (1955)

(263) Turba, F. and G. Gundlach: Biochem. J. 327, 186 (1955)

(264) Uriel, J., P. Grabar and P. Burtin: Analyse Immunoelectrophoresique chap. II. p. 51. Paris: Masson & Cie. (1960)

(265) Vorhaus, L.J., H.H. Scudamore and R.M. Kark: Messung der Serumcholinesterase-Aktivität zum Studium der Lebererkrankungen und Erkrankungen der Gallenwege. Gastroenterology 15, 304 (1950)

(266) - , H.H. Scudamore and R.M. Kark: Amer. J. Sc. 221, 140 (1952)

(267) - and R.M. Kark: Serum cholinesterase in health and disease. Amer. J. Med. 14, 707 - 19, (1953)

(268) Weber, H. u. R. Richterich: Klin. Wschr. 41, 665 (1963)

(269) Weber, H.: Rasche und einfache Ultramikromethode zur Bestimmung der Serumcholinesterase. Dtsch. med. Wschr. 91, 1927 (1966)

(270) Weidemann, H.: Med. klin. 58, 1759 (1963)

(271) Wense: Z. Fermentforschung 15, 290 (1937)

(272) Wetstone, H.J., R. Tennant, D.V. White, R.V. LaMotta and H.M. Williams: Gastroenterologie 33, 41 (1957)

(273) - , R.V. LaMotta, A. Bellucci, R. Tennant and B.V. White: Studies on serum cholin esterase activity. Ann. intern. Med. 52, 102 (1960)

(274) Whittaker, V.P.: Physiol. Rev. 31, 312 (1951)

(275) - and S. Wijesundera: Biochem. J. 52, 475 (1952)

(276) - in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Hrsg. von Eichler u. A. Farah. Bd. 15. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963

(277) - : Acta genet. (Basel) 14, 281 (1964)

(278) Wilson, A., G.A. Maw and H. Geoghegan: Quart. J. Med. 20, 13 (1951)

(279) Wilson, I.B. u. F. Bergmann: J. biol. Ch. 185, 479, 186, 683 (1950)

(280) - - u. D. Nachmansohn: J. biol. Ch. 186, 781 (1950)

(281) Wilson, I.B. u. D. Nachmansohn: Adr. Enzymol. 12, 259 (1951)

(282) - : Biochem. biophys. Acta 7, 466, 520 (1951) J. Biol. Ch. 197, 215 (1952)

(283) - : J. biol. Ch. 208, 123 (1954)

(284) - in: McElroy, W.D. and B. Glass (Hrsgg.): The Mechanism of Enzyme Action, S. 642, Baltimore (1954)

(285) - , M.A. Hatch and S. Ginsburg: J. biol. Ch. 235, 2312 (1960)

(286) - , M.A. Harrison and S. Ginsburg: J. biol. Ch. 236, 1498 (1961)

(287) - and J. Alexander: J. biol. Chem. 237, 1323, 1326 (1962)

(288) Wolfsie, J.H. and G.D. Winter: Statistical Analysis of normal Human Red Blood Cell and Plasma Cholin Esterase Activity Values. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. 6, 43 - 49 (1952)

(289) Zech, R., W.D. Erdmann u. H. Engelhard: Grenzen der Therapie mit Oximen bei Vergiftungen mit insecticiden Alkylphosphaten. Arzneim.-Forsch. 17, 1196 - 1202 (1967)

(290) Zeller, E.A. u. A. Bisegger: Helv. 26, 1619 (1943)

Ich bedanke mich bei meinem Dr.-Vater Herrn Priv.-Doz. Dr. Maximilian Knedel für seine Anregung und die großzügige Unterstützung bei der Laboratoratoriumsarbeit und bei den Assistentinnen des Klinisch-chemischen Institutes am Städt. Krankenhaus München - Harlaching für ihre Hilfe bei der experimentellen Arbeit. Auch Herrn Peter Sandel, der mir bei den statistischen Berechnungen geholfen hat und Herrn Jens Funke, der die Photographien der graphischen Darstellungen anfertigte, gilt mein Dank.

Lebenslauf

Ich wurde am 3.1.1941 in Leipzig geboren. Mein Vater, Arno Böttger, war Maurer, meine Mutter, Martha Böttger, Hausfrau. Von 1947 - 1955 besuchte ich die Grundschule in Leipzig, von 1955 - 1958 die Oberschule in Grimma/Sachsen als Internatsschüler.

Im Sommer 1958 verließ ich die DDR und konnte in Waldshut/Baden weiterhin das Gymnasium besuchen. Im Frühjahr 1961 machte ich dort das Abitur.

Das Studium der Medizin begann ich 1961 in Freiburg, wo ich bis zum Physikum im Sommer 1964 blieb. Das klinische Studium absolvierte ich in München und machte dort im Wintersemester 1967/68 das Staatsexamen.

Die Pflichtassistentenzeit verbrachte ich im Stadt- und Kreiskrankenhaus Alfeld/Leine (Chirurgie), im Städt. Krankenhaus München - Harlaching (Klinische Chemie) und im Städt. Krankenhaus Furth i. Wald (Inner Medizin).

Im August 1968 heiratete ich die Verlagsredakteurin Heide Gaiser; seit Oktober 1970 haben wir einen Sohn.

Im Januar 1970 erhielt ich die Approbation als Arzt. Von März bis September habe ich mehrere praktische Ärzte vertreten.

Vom 15.9.70 bis 30.9.71 war ich Assistent in der Inneren Abteilung des Krankenhauses Josefinum in München und anschließend bis zum 31.7.72 im Institut für Anaesthesiologie der Universität München.

Seit 1.8.72 arbeite ich als Assistent in der Pädiatrischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München Harlaching.